

REC'D 29 OCT 1999  
WIPO PCT

09/762230

PCT/JP99/04197

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

4

04.08.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1999年 6月28日

17/02

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第182362号

出願人  
Applicant(s):

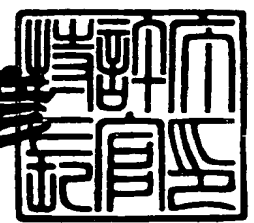
メルシャン株式会社

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年10月15日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3059924

【書類名】 特許願

【整理番号】 9906097

【提出日】 平成11年 6月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/11  
C12N 1/21  
C12P 7/46

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県藤沢市湘南台7-37-2-215

    【氏名】 藤井 匡

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県座間市南栗原4-2-42-312

    【氏名】 成田 隆夫

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県藤沢市立石1-8-10

    【氏名】 仲田 邦穂

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県秦野市南が丘3-2-1-419

    【氏名】 上松 仁

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県藤沢市辻堂新町1-2-7-1105

    【氏名】 恒川 博

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県座間市南栗原2-2-17

    【氏名】 一色 邦夫

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県綾瀬市吉岡1782-10

    【氏名】 吉岡 武男

【特許出願人】

【識別番号】 000001915

【氏名又は名称】 メルシャン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100060782

【弁理士】

【氏名又は名称】 小田島 平吉

【選任した代理人】

【識別番号】 100094293

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤井 幸喜

【選任した代理人】

【識別番号】 100103311

【弁理士】

【氏名又は名称】 小田嶋 平吾

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成10年特許願第232382号

【出願日】 平成10年 8月 5日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 019666

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子およびその使用

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フラボバクテリウム リュテセンス (Flavobacterium lutescens) に属する細菌から得ることのできる L-ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子、あるいは該遺伝子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ L-ホモグルタミン酸の生産能が欠損したフラボバクテリウム リュテセンスの突然変異体の該生産能を回復しうる機能を有する改変体を含んでなる単離された純粋な DNA。

【請求項2】 L-ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子が、L-リジン：2-オキシグルタル酸 6-アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質およびピペリジン-6-カルボン酸 デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質からなる群より選ばれる少なくとも1種のタンパク質を一部にまたは全体としてコードする DNA である請求項1記載の DNA。

【請求項3】 L-リジン：2-オキシグルタレート 6-アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA が配列番号：1の塩基 801～塩基 2276 までの連続する塩基配列を含んでなる請求項2記載の DNA。

【請求項4】 配列番号：1の塩基配列または配列番号：1の塩基 545～塩基 2658 までの連続する塩基配列を有する請求項3記載の DNA。

【請求項5】 ピペリジン-6-カルボン酸 デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA が、配列番号：2の塩基 2855～塩基 4387 まで連続する塩基配列を含んでなる請求項2記載の DNA。

【請求項6】 配列番号：2の塩基配列または配列番号：2の塩基 2077～塩基 4578 までの連続する塩基配列を有する請求項5記載の DNA。

【請求項7】 請求項1記載の DNA を担持する自律複製性または組込み複製性の組換えプラスミド。

【請求項8】 前記 DNA が配列番号：1の塩基 545～塩基 2658 までの連続する塩基配列および／または配列番号：2の塩基 2077～塩基 4578

までの連続する塩基配列を有する請求項 7 記載の組換えプラスミド。

【請求項 9】 フラボバクテリウム リュテセンス IFO 3084 (pCF213) (FERM P-16699) から得ることのできる請求項 7 記載の組換えプラスミド。

【請求項 10】 宿主としてフラボバクテリウム属に属する細菌を請求項 7 記載の組換えプラスミドで形質転換した形質転換体。

【請求項 11】 請求項 10 記載の形質転換体を培地で培養し、培養中または培養後に、増殖した形質転換体を L-リジンまたは L-ピペリジン-6-カルボン酸と接触させ、L-ホモグルタミン酸に変換し、こうして生産された L-ホモグルタミン酸を回収することを特徴とする L-ホモグルタミン酸の生産方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子操作に関し、より具体的には、L-ホモグルタミン酸（または L-2-アミノアジピン酸もしくは L- $\alpha$ -アミノアジピン酸とも称されている）の生産に関与する遺伝子を含む DNA、ならびにそれらを使用する L-ホモグルタミン酸（以下、単にホモグルタミン酸という）の生産系に関する。

【0002】

【発明の背景】

ホモグルタミン酸は、細菌であるコレラ ビブリオ (*Cholera vibrio*)、トウモロコシ (*Zea mays*) をはじめとする植物体、カエルの胚など、生物界に広く見いだされている。真菌類などにおいてはリジン生合成の中間体として、そして  $\beta$ -ラクタム系抗生物質の生合成においては前駆体としての位置を占めている。また、ホモグルタミン酸は、メトトレキセート誘導体 (WO 92/09436) を始めとする各種医薬品の合成中間体としても有用である。

【0003】

ところで、ホモグルタミン酸の化学合成による製造は光学分割や多段階反応を必要とすることから、コスト的に有効な手段とはなっていない。一方、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、アルカリゲネス

(Alcaligenes)、ブレビバクテリウム (Brevibacterium)、バチルス (Bacillus) 属に属する微生物を用いて、L-リジンから製造する方法 (特開平 6-181787 号公報) が知られている。また本発明者らの一部も、フラボバクテリウム (Flavobacterium) 属に属する微生物を用いて、L-リジンからホモグルタミン酸を製造する方法を提案した (WO 96/31616)。しかしながら、これらの微生物を用いる方法においても、さらに効率よくホモグルタミン酸を製造できる方法が切望されている。

## 【0004】

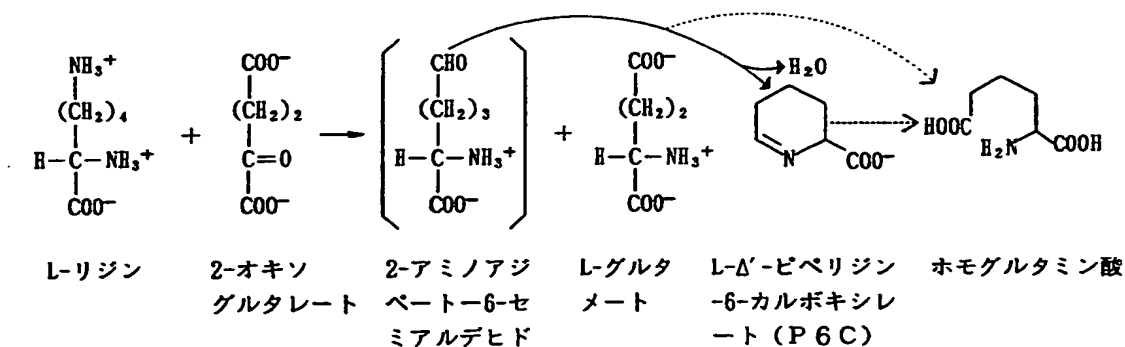
そこで、本発明者らは、上記いずれかの微生物におけるホモグルタミン酸の生産系を、例えば遺伝子操作により増強することを目差した。かような操作に際し、参考にしうる情報について概観すると、例えば、セファマイシン C の生合成経路の研究の一端として、セファマイシン C 生産菌であるストレプトマイセス クラブリゲルス (Streptomyces clavuligerus) の L-リジンから  $\alpha$ -アミノアジピン酸 (または、ホモグルタミン酸) への変換に関与するリジン-6-アミノトランスフェラーゼや、 $\Delta$ -1-ピペリジン-6-カルボン酸デヒドロゲナーゼの存在、また、前者については、該酵素をコードする遺伝子の存在位置等が確認されている (Fuente et al., Biochem. J. (1997) 327, 59-64)。

## 【0005】

また、L-リジンのバイオアッセイに用いられているフラボバクテリウム リュテセンス (Flavobacterium fuscum から再同定された) IFO 3084 について、下記のような経路を触媒する 2-オキシグルタル酸 6-アミノトランスフェラーゼ [またはリジン 6-アミノトランスフェラーゼ (以下、LAT ともいう)] が存在することが知られている (Soda et al., Biochemistry 7 (1968), 4102-4109, 同 4110-4119)。

## 【0006】

【化 1】



上記バイオアッセイでは、ピペリジン-6-カルボン酸（以下、P6Cともいう）をo-アミノベンズアルデヒドと反応させて得られる生成物の吸光度が測定されている。また、L-リジンの別のバイオアッセイでは、アグロバクテリウム ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のL-リジン6-デヒドロゲナーゼ活性が利用されている (Misono et al., J. Biochem. (Tokyo) 105 (1989), 1002-1008)。

**【 0 0 0 7 】**

## 【発明の構成】

上記 I F O 3 0 8 4 株は、上記のごとく L-リジンのバイオアッセイに常用されており、使用方法も確立されている。したがって、該 I F O 3 0 8 4 株が L A T に加えて、P 6 C（または、生体内では量的に平衡状態にあるといわれる 2-アミノアジピン酸セミアルデヒド）のデヒドロゲナーゼ（以下、単にデヒドロゲナーゼともいう）活性タンパク質をコードする遺伝子を有するなら、本発明の目的、すなわち、ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子を提供するとの目的に沿った遺伝子クローニング用の候補菌となり得るであろう。

【0008】

本発明者らは、フラボバクテリウム リュテセンスのリジン—6—アミノトランスフェラーゼ（LAT）遺伝子（lat）および、場合によって、P6Cに対するデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子のクローニングを試みてきた。しかし、かようなクローニング方法として、常用されている他の細菌のアミノトランスフェラーゼとのDNAコンセンサス配列から目的の遺伝子

を取得する方法や精製されたタンパク質のアミノ酸配列を決定した結果から得られる情報を利用する方法などは、初期の研究では、いずれも失敗に帰した。

# 【0009】

ところが、意外なことに、本発明者が、最終的に選択した宿主-ベクター系を使用すれば、ショットガンクローニングにより、少なくともホモグルタミン酸の生産に関与しうる遺伝子、より具体的にはP6Cに対するデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子がクローニングできることを見出した。また、かような遺伝子と一定の相同性（または同一性）を有する改変体も同様に機能することも見出した。

# 【0010】

一方、上記 Soda et al., Biochemistry, 7 (1968)、4110-4119には、アクロモバクター リクウダム (Achromobacter liquidum) (= Flavobacterium lutescence) から分子量116,000の結晶LATの取得方法が記載されており、そして Yagi et al., J. Biochem. 87 (1980)、1395-1402にはフラボバクテリウム リュテセンスからのLATがA、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>およびCの4つの非同一性サブユニットから構成されていることも記載されている。これらの記述に基づき、精製されたLATタンパク質のアミノ酸配列決定から得られた情報を利用して、LAT活性を有するタンパク質をコードする遺伝子をクローニングする初期の研究は失敗に帰した。しかし、これらの先行技術文献に記載されている方法とは全く異なる方法を用い、フラボバクテリウム リュテセンスからLAT活性を有するタンパク質を精製し、得られたタンパク質のアミノ酸配列決定を行い、それらの配列情報を利用して目的の遺伝子のクローニングを行ったところ、LATをコードする遺伝子 (lat) をクローニングすることに成功した。

# 【0011】

したがって、本発明によれば、フラボバクテリウム リュテセンス (Flavobacterium lutescens) に属する細菌から得ることのできるホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子、あるいは該遺伝子にストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつホモグルタミン酸の生産能を欠損した突然変異体の該生産能を回復し



うる機能を有する改変体を含んでなる単離された純粋なDNAが提供される。

【0012】

より具体的には、上記ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子は、LAT活性を有するタンパク質およびデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質からなる群より選ばれる少なくとも1種のタンパク質を一部にまたは全体としてコードするDNAあるいは、それらの改変体である。

【0013】

本発明は、上記DNAを担持する自律複製性または組込み複製性の組換えプラスミド、さらには、該組換えプラスミドで形質転換した形質転換体、さらには該形質転換体を使用するホモグルタミン酸の生産方法にも関する。

【0014】

【発明の具体的な態様】

本発明に従う遺伝子の起源としては、例えば、フラボバクテリウム リュテセンス（以下、F. lutescens ともいう）を宿主として発現しうるホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子を提供しうるものであれば、自然突然変異株を包含する F. lutescens の如何なる菌株であってもよい。しかし、入手容易であり、培養等の好適な取り扱い条件が確立されている、上記 IFO 3084 株を好ましいものとして挙げることができる。

【0015】

本発明にいう、ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子とは、L-リジンから P6C (LAT活性) または P6C と化学的に平衡関係にある 2-アミノアジピン酸-6-セミアルデヒドを経てホモグルタミン酸に至る (デヒドロゲナーゼ活性) 2段階の変換系に関与しうるいずれかの遺伝子を意味する。まず最初に、後者の変換系であるデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の具体的なものとしては、本発明者らが以下のような戦略に基づいて確立した宿主-ベクター系を使用して得ることのできるものが挙げられる。

【0016】

F. lutescens の遺伝子操作を行うためには、F. lutescens の適当な宿主-ベクター系の確立が必要であるが、これには次の3つの課題を解決する必要がある

(1) F. lutescens

内で自律複製するレプリコンを得る。

(2) F. lutescens

内で発現し、かつ機能する薬剤耐性マーカーを得る。

(3) F. lutescens

内へのDNA導入法を確立する。

【0017】

上記(1)および(2)の課題は、幸運なことに、最近 Mo Bi Tec 社より発売された、広範囲のグラム陰性細菌で自律複製し、カナマイシン、クロラムフェニコール耐性を有する pBBR122 が使用できることを見い出して解決できた。上記(3)の課題解決には、まず、上記プラスミド pBBR122 の F. lutescens 内への導入法が確立されることが前提になる。ところが、エレクトロポレーション法による E. coli への DNA 導入法をもとに検討した結果、カナマイシン  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  を含む L プレートに F. lutescens のコロニーが生え、これを液体培養してアルカリ SDS 法によってプラスミドを抽出したところ pBBR122 は安定に F. lutescens に保持されていることを確認できた。こうして、上記(3)の課題も解決できた。この宿主-ベクター系は、他のバクテリアを宿主にした場合には、(a) 形質転換効率が非常に高く、(b) 適当な大きさの DNA 断片を pBBR122 に挿入できることそれ自体は知られていたが (J. Bac. 178 (1996), 1053-1060)、F. lutescens でも前述の (a)、(b) が可能なことを明らかにし、さらに取得した遺伝子を F. lutescens 内で増幅することが可能にしたばかりでなく、P6C に対するデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子をショットガンクローニングによって取得することも可能にした。さらに操作を容易にすべく pBBR122 のクロラムフェニコール耐性遺伝子の代わりに pUC19 のマルチクローニングサイトを導入した pCF704 を作成し、これを以後ベクターとして用いた。

【0018】

次に、取得または増幅した遺伝子を評価する系を確立するため、F. lutescens

I F O 3084 に N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) により突然変異を誘発させ、エオジン Y を含む MEM プレート (pH 7.0) を用いてスクリーニングした。

## 【0019】

こうして取得した、ホモグルタミン酸を全く生産しない第一変異株とわずかしか生産しない第二および第三変異株を取得した。このホモグルタミン酸を全く生産しない第一変異株には野生型株と同等の lat 活性が確認され、わずかしか生産しない第二および第三変異株には lat 活性がわずかしか確認されなかった。すなわち、第一変異株は lat 以外のホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子に何等かの傷害を受けており、一方第二および第三変異株には少なくとも lat に何等かの傷害を受けている可能性がある。

## 【0020】

次に、野生型株のゲノム DNA を SauIIIAI で部分消化し、その 6-8 Kbp 断片を pCF704 の BamHI 部位に挿入した DNA ライブラリーを作成した。これらを上記第一、第二および第三変異株にそれぞれ導入し、ホモグルタミン酸生産能を回復する株をスクリーニングした。この際、変異株のスクリーニングに使用したエオジン Y を含む MEM プレート (pH 7.0) で黒くなるコロニーを拾い、TLC でホモグルタミン酸生産能を確認するという方法を用いた。なお、これらの変異株の代表的なものとし、第二変異株 (Flavobacterium lutescens 2nd mutant) は、平成 10 年 7 月 6 日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託され、受託番号 FERM P-16874 が付され、そして第一変異株 (Flavobacterium lutescens 1st mutant) は、平成 11 年 6 月 10 日付で同研究所に寄託され、受託番号 FERM P-17419 が付されて、それぞれ保管されている。

## 【0021】

この結果、第一変異株のホモグルタミン酸の生産性を相補するプラスミドを有する株および第二変異株のホモグルタミン酸の生産性を部分的に相補するプラスミドを有する株がそれぞれ得られた。しかし、これらの株、特に第二変異株を相補する株のプラスミドは欠失が起きやすらしく、安定なプラスミドを取得する

ためのさらなるスクリーニングが必要であった。制限酵素処理によるDNAフラグメント解析の結果、こうして得られた第一変異株を相補し、第二変異株を部分的に相補する pCF111 と命名したプラスミドと pCF213 と命名したプラスミドは見かけ上全く同一のプラスミドであった。

## 【0022】

一方、pCF111 および pCF213 を第一、第二および第三変異株にそれぞれ再形質転換し、ホモグルタミン酸生産能を TLC で調べた。この結果両プラスミドとも第一変異株を相補したが、第二および第三変異株は部分的に相補しただけであった。

## 【0023】

かような相補試験に基づき、ホモグルタミン酸の生産性が欠損した変異株のホモグルタミン酸生産能を十分に回復するプラスミドには、本発明に従う少なくともホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子、より具体的には *lat* 以外のいずれかの遺伝子が存在することになる。

## 【0024】

したがって、限定されるものでないが、本発明にいう「L-ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子の一つとしては、プラスミド pCF213 のインサート部分に含まれており、デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を挙げることができる。例えば、この遺伝子は配列番号：2 に示される配列中に存在する。

## 【0025】

一方、前者の変換に関与する、すなわち本発明に従う LAT 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子は、次のようにしてクローニングできる。

## 【0026】

一定の培養条件下にて *E. lutescens* を培養して取得した菌体を破碎した後、破碎液を遠心分離して菌体破碎物を除去し、こうして得られる細胞抽出液から、超遠心処理、硫酸アンモニウム沈殿、脱塩、イオン交換カラムクロマトグラフィー、アフィニティーカラムクロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動、等を経て、目的のタンパク質を単離精製する。

## 【0027】

精製されたタンパク質のN末端アミノ酸配列の解析結果から、DNAプライマーを設計し、*F. lutescens* (IFO 3084) 株のゲノムDNAに対してPCRを行う。PCRで増幅されたDNA断片をもとにさらにPCRを行い、該DNA断片の両外側の周辺領域を取得する。こうして、本発明の目的とするタンパク質をコードするDNAが得られる。

## 【0028】

したがって、L-ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子のもう一つとして、LAT活性を有するタンパク質をコードするDNAが提供可能になる。すなわち、本発明のもう一つの遺伝子としては、例えば、配列番号：1に示される塩基配列のコーティング領域を構成する配列を有するものを挙げることができる。なお、対応する精製されたタンパク質のN末端は、配列番号：1に記載されるとおりSerであるが、その上流の遺伝子にコードされるMetまでのアミノ酸配列は、翻訳後にプロセッシングを受けて除かれるものと考えられる。

## 【0029】

さらに、本発明にいうホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子を含んでなるDNAには、上記のデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子とLAT活性を有するタンパク質をコードする遺伝子がそれぞれ1個以上含まれているDNAも包含される。

## 【0030】

加えて、本発明にいう遺伝子には、上記両遺伝子の改変体であって、それぞれ両遺伝子に対して、一定のハイブリダイゼーション条件下、例えば、60℃で2×SSC（標準クエン酸食塩水）中、好ましくは60℃で0.5×SSC中、特に好ましくは60℃で0.2×SSC中のストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、かつホモグルタミン酸の生産能が欠損した。*F. lutescens* の突然異変体の該生産能を回復しうる機能を有する改変体も包含される。

## 【0031】

より具体的には、デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝

子の改変体は、配列番号：2における塩基2855～塩基4387の塩基配列と少なくとも70%の同一性を示すものであり、また、LAT活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の改変体は、配列番号：1における塩基545～塩基2658の塩基配列（コーディング領域）と少なくとも50%、好ましくは70%、さらに好ましくは95%の同一性を示すものである。

#### 【0032】

このような改変体は、上記両配列の、それぞれ、5'末端もしくは3'末端または途中において塩基が除去または付加されたもの、あるいは塩基の一部が他の塩基により置換されているものを含む。この塩基の一部が他の塩基により置換されている改変体には、同一のタンパク質をコードするが、遺伝暗号の縮重に伴い、上記両遺伝子と異なる塩基配列を有するものも含まれる。

#### 【0033】

遺伝暗号の縮重に伴うもの以外の塩基の置換は、それぞれ、上記両遺伝子がコードする推定アミノ酸配列を参照し、各アミノ酸に由来する側鎖の類似性、例えば疎水性、親水性、電荷、大きさなどを基準に、タンパク質全体として類似の形状を有するように、行うのがよい。こうして、改変体は、上記両遺伝子と同等の機能、すなわち、ホモグルタミン酸の生産能が欠損した *F. lutescens* の突然変異体の該生産能を回復しうる機能を有するものが、相当高い確率で得られるであろう。

#### 【0034】

本発明に従う改変体は、上記両遺伝子の塩基配列またはそれらによってコードされる推定アミノ酸配列を参考に、核酸合成機を用いて合成するか、あるいは、自体既知の点突然変異誘発または部位特異的突然変異誘発により作成することができる。

#### 【0035】

本発明によれば、上記のような遺伝子または改変体を担持する、組換えプラスミドとしても提供することができる。かようなプラスミドは、上記遺伝子または改変体以外に、自律複製配列、プロモーター配列、ターミネーター配列、薬剤耐性遺伝子等を含む自律複製性であることができる。さらに、プラスミドは、使用

が予定される宿主のゲノムの一定領域と相同の配列を含め、組込み型プラスミドであることもできる。例示として、デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含むDNAを担持する自律複製性の組換えプラスミドとしては、プラスミド pBBR122 や、pBBR122 の特定の部位にマルチクローニング部位を挿入するかまたは該部位もしくは領域をマルチクローニング部位で置換し、そのマルチクローニング部位を介して上記遺伝子や改変体を挿入したものが挙げられる。このようなプラスミドの具体的なものとしては、本明細書でプラスミド pCF111 および pCF213 と称するものを挙げることができる。pCF213 は、平成10年3月11日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託され、受託番号 FERM P-16699 が付された、Flavobacterium lutescens IFO 3084 (pCF213) から、それ自体既知のプラスミド単離法により得ることができる。LAT活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含むDNAを担持する組換えプラスミド、および両遺伝子を含むDNAを担持する組換えプラスミドも、上記 pCF213 と同様に作成することができる

## 【0036】

本発明によれば、さらに、宿主としてフラボバクテリウム属に属する細菌を、上記組換えプラスミドで形質転換して得られる形質転換体も提供される。フラボバクテリウム属に属する宿主細菌は、本発明の目的に沿う限り、如何なる種の如何なる株であってもよいが、好ましいものとしては、F. lutescens IFO 3084 および F. lutescens SP.7-1 (FERM BP-5457) を挙げることができる。

## 【0037】

したがって、上記形質転換体の具体的な一例としては、F. lutescens IFO 3084 および F. lutescens SP.7-1 を pCF213 で形質転換したものを挙げることができ、F. lutescens IFO 3084 (pCF213) は、上記 FERM P-16699 で生命工学工業技術研究所に寄託されている。

## 【0038】

本発明によれば、また、上記形質転換体を用いるホモグルタミン酸の生産方法が提供される。かような方法では、培地で培養中に増殖した形質転換体を、出発

原料、L-リジンまたは場合により、P6C（もしくは2-アミノアジピン酸-6-セミアルデヒド）と接触させるか、あるいは増殖した形質転換体またはその処理菌体（例えば、有機溶媒処理物、菌体抽出物、固定化処理物）と接触させ、出発原料をホモグルタミン酸に変換する。

## 【0039】

培地の炭素源としては、形質転換体の利用可能なものであれば如何なるものも使用でき、宿主として、*F. lutescens* を用いた場合には、例えば、グルコース、フルクトース、シュクロース、デキストリンなどの糖類、グリセロール、ソルビトールなどの糖アルコール、フマル酸、クエン酸等の有機酸を使用でき、これらの炭素源の培地への添加量は、通常、0.1～10重量%（以下、%と略称する）程度とすることが望ましい。

## 【0040】

培地の窒素源としては、例えば、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸アンモニウム塩やフマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム等の有機酸アンモニウム塩ないし、肉エキス、酵母エキス、コーンスティーブリカー、カゼイン加水分解物等の天然窒素源を使用でき、これらの窒素源の培地への添加量は、通常、0.1～10%程度とすることが望ましい。

## 【0041】

また、無機塩類としては、例えば、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム等のリン酸アルカリ金属塩や塩化カリウム、塩化ナトリウム、等の塩化アルカリ金属塩、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄等の硫酸金属塩を使用でき、これらの無機塩類の培地への添加量は、通常、0.001～1%程度とすることが望ましい。

## 【0042】

これらのうち、通常の細菌用の増殖培地を用いた液体培養が好ましく、炭素源としてはグルコース、マルトース、澱粉などが、窒素源としては硫酸アンモニウム、ペプトン、酵母エキス、大豆粉などが特に有効である。その他に、無機塩としてリン酸カリウム、硫酸マグネシウム、食塩などが通常用いられる。

## 【0043】

微生物の培養は、上記の培地で20～40℃、好ましくは28～37℃でpH



は5～9、好ましくは6～8で好氣的条件下で実施すればよい。

【0044】

培養中に、上記により増殖した形質転換体と出発原料の接触は、予め培地に出発原料を加えておくか、または培養中に出発原料を適宜加えることにより行う。また、培養終了後に、集菌した菌体または処理菌体と出発原料を培地または適当な緩衝液中で、必要により適当な補酵素等を加え、反応器中で攪拌または振盪するか、固定された菌体上に出発原料含有物を流動させることにより、上記接触を行うことができる。

【0045】

培養中に形質転換体とL-リジンを接触させる場合を例に、さらに具体的に説明すると次のとおりである。培地に形質転換体を接種した後、例えば、20～40℃で12～120時間培養することにより、形質転換体である微生物を1ml中に $10^6 \sim 10^{10}$ 個含む菌株培養液を得、その培養液に原料化合物であるL-リジンを通常、最終濃度が0.5～30mg/mlになるように水または補助溶剤に溶解して加えるか、または溶解せずにそのまま添加し、通常、20～40℃で18時間～7日、好ましくは18時間～5日反応させ、陽イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂等を用いた各種イオン交換クロマトグラフィー、HP20などの吸着クロマトグラフィー、溶媒や温度を利用した沈殿化や結晶化等の通常の精製手段によりホモグルタミン酸を得ることができる。

【0046】

添加するL-リジンの形状及び添加時期については特に制限されるものではないが、溶解性などの点から一塩酸塩として用いるのが好ましく、培養開始時の添加でもよく培養途中1～5日目にも添加してもよい。

【0047】

本発明によれば、L-リジンをホモグルタミン酸に変換するホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子を含むDNAが提供される。このDNAは、ホモグルタミン酸の微生物学的な生産方法において有用である。また、本発明によれば、ホモグルタミン酸を効率よく生産しうる形質転換体およびその使用によるホモグルタミン酸の生産方法も提供される。

【0048】

【実施例】

以下、具体例により本発明をさらに詳細に説明する。

【0049】

実施例 1 : デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子のクローニング等

1. ホモグルタミン酸非生産株の取得

*F. lutescens* IFO 3084 株を L 培地 (ポリペプトン 1.0%、酵母エキス 0.5%、NaCl 0.5%、グルコース 0.1%、pH 7.2) 3 ml に植菌し、32℃で一晩振盪培養した。これを種菌としてその 100  $\mu$ l を L 培地 50 ml に植菌し、32℃で 4.5 時間振盪培養した。この培養液から菌体を 500  $\times$  g、10 分間の遠心分離で集菌し、0.2 M リン酸バッファー (pH 6.0) で一回洗浄し、0.2 M リン酸バッファー (pH 6.0) 6 ml に懸濁した。この菌体懸濁液に 80 mg/ml NTG を 50  $\mu$ l 加え、32℃で 20 分間振盪培養した。この培養液から集菌した菌体を 0.2 M リン酸バッファー (pH 6.0) で一回洗浄し、全量を L 培地 50 ml に植菌し、32℃で一晩振盪培養した。この培養液を 500  $\mu$ l ずつ分注し、これに 60% グリセロール溶液 500  $\mu$ l を加えてよく混合し、-70℃で凍結保存したものを変異株保存液とした。

【0050】

この変異株保存液を 0.85% NaCl で  $10^6$  倍希釈し、8 cm シャーレの M EM 寒天培地 pH 7.2 (ポリペプトン 0.5%、酵母エキス 0.2%、リジン-HCl 1.0%、メチレンブルー 0.006%、エオジン Y 0.04%、寒天 1.5%、pH 7.2) に 100  $\mu$ l ずつ塗布し、32℃で三日間培養した。生えてきたコロニーのうち白色を呈しているコロニーをスクリーニング培地 (ポリペプトン 1.0%、酵母エキス 0.2%、リジン-HCl 1.0%、pH 7.2) 1 ml に植菌し、32℃で二日間振盪培養した。この培養液 3  $\mu$ l をシリカゲル TLC プレートの各レーンに滴下し乾燥させた。このプレートをブタノール：酢酸：水 (3:1:1) からなる溶媒系で展開し、ニンヒドリン発色して各クレーン毎にホモグルタミン酸の有無を調べた。このようにして変異株の中から全くホモグ

ルタミン酸を生産しない第一変異株 (FERM P-17419) と、ほんのわずかだけホモグルタミン酸を生産する第二変異株 (FERM P-16874)、第三変異株を分離した。L-リジンからホモグルタミン酸への変換能 (またはホモグルタミン酸の生産性) を TLC 分析により調べた結果を図 1 に示す。なお図 1 中ホモグルタミン酸は HG と表示されている (他の図においても同様)。また、これらの変換株における lat 活性の測定結果を図 2 に示す。

#### 【0051】

#### 2. 宿主-ベクター系、形質転換系の構築

*F. lutescens* IFO 3084 株を L 培地 3 ml に植菌し、32℃で一晩振盪培養した。これを種菌としてその 100  $\mu$ l を L 培地 50 ml に植菌し、32℃で 4.5 時間振盪培養した。この培養液から菌体を 5000 $\times$ g、10 分間の遠心分離で集菌し、10%グリセロール溶液で一回洗浄し、10%グリセロール溶液 3 ml に懸濁した。この懸濁液を 200  $\mu$ l ずつ分注し、-70℃で凍結保存したものをエレクトロセル保存液とした。この保存液を氷上で融解し、Broad Host Range Vector pBBR122 (Mo Bi Tec 社) 200  $\mu$ g/ml TE 溶液 1  $\mu$ l を加えた。これを 0.2 cm のエレクトロキュベット (Electrocuvette) (BIORAD 社) に入れ、ジーンパルサー (Gene Pulser) II (BIORAD 社) を用い 2.4 KV、200  $\Omega$ 、25  $\mu$ F の条件で一回電気パルスをかけた。このセルをファルコン (Falcon) チューブに入れ、氷冷した L 培地 1 ml を加え、32℃で 2 時間振盪培養した。この培養液をカナマイシン 20  $\mu$ g/ml を含む L 寒天培地 (ポリペプトン 1.0%、酵母エキス 0.5%、NaCl 0.5%、グルコース 0.1%、寒天 1.5%、pH 7.2) に塗布し、32℃で三日間培養した。2.4 $\times$ 10<sup>5</sup>個の形質転換株を得た。

#### 【0052】

#### 3. プラスミド pCF704 の構築

末端に EcoRI サイトと NcoI サイトを付着したプライマーを合成 (ファルマシア社) し、Taq ポリメラーゼ (Taq polymerase) (ファルマシア社) と PCR サーマルサイクラー (Thermal Cycler) PERSONAL (TaKaRa 社) を用い、pUC18 のマルチクローニングサイトとその周辺領域 95 bp を増幅した。この D

NA断片を制限酵素EcoRIとNcoIで消化し、pBBR122のEcoRI、NcoIサイトにLigation Kit version 2 (TaKaRa 社)を用いて連結反応した。この反応液でE. coli コンピテント細胞JM109 (TaKaRa 社)を形質転換して得た形質転換株からQIAGEN Plasmid Midi Kitを用いてプラスミドpCF704を調製した。

【0053】

4. プラスミドpCF213の構築

F. lutescens IFO 3084株のゲノムDNAをQIAGEN Blood and Cell Culture DNA Kitに従って抽出精製した。このゲノムDNAを制限酵素SauIIAIで部分分解し、その6~8Kbp断片をアガロースゲルから切り出し、ウルトラフリーC3ユニット0.45μm (ミリポア社)を用いてDNAを回収精製しTE溶液に溶解したものをインサートDNA溶液とした。一方、pCF704を制限酵素BamHIで消化し、アルカリ性ホスファターゼで脱リン酸化した。これとインサートDNA溶液とをLigation Kit version 2 (TaKaRa 社)を用いて連結反応したものをDNAライブラリーとした。

【0054】

このDNAライブラリーを第二変異株のエレクトロセル保存液に加え、電気パルスをかけた。このセルをFalcon チューブに入れ、氷冷したL培地1mlを加え、32℃で2時間振盪培養した。この培養液全量をカナマイシン20μg/mlを含む50ml L培地に植菌し32℃で二日間振盪培養した。この培養液を500μlずつ分注し、これに60%グリセロール溶液500μlを加えてよく混合し、-70℃で凍結保存したものを相補株保存液とした。

【0055】

この相補株保存液を0.85%NaClで10<sup>3</sup>倍希釈し、8cmシャーレのMEM寒天培地pH7.0 (ポリペプトン0.5%、酵母エキス0.2%、リジン-HCl 1.0%、メチレンブルー0.006%、エオジンY0.04%、寒天1.5%、pH7.0)に100μlずつ塗布し、32℃で三日間培養した。一面に生えてきた菌体のうち黒色を呈している部分を相補株混合菌体とした。この相補株混合菌体をスクリーニング培地3mlに植菌し、32℃で二日間振盪培養した。

。この培養液  $3 \mu\text{l}$  をシリカゲル TLC プレートの各レーンに滴下し乾燥させた。このプレートをブタノール：酢酸：水（3：1：1）からなる溶媒系で展開し、ニンヒドリン発色により各レーン毎にホモグルタミン酸の有無を調べた。このようにしてホモグルタミン酸生産能を回復している相補株混合菌体を選び、さらにシングルコロニーに分離し、ホモグルタミン酸生産能を回復している株を選び、これらを相補株とした。これらの相補株をから QIAGEN Plasmid Midi Kit を用いて調製した一つのプラスミドを pCF213 とした。pCF213 には約 6.5 Kbp のインサート DNA が挿入されていた。なお、別途得られたプラスミド pCE111 の各変異株に対する相補性と共に、上記 pCF213 の相補性を調べた結果を、図 3 に示す。

## 【0056】

## 5. pCF213 によるホモグルタミン酸生産能の向上

pCF704 で野生型 *F. lutescens* IFO 3084 株を形質転換した株を Wild pCF704 株、pCF213 で形質転換した株を Wild pCF213 株とした。両者をカナマイシン  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  を含むスクリーニング培地  $3 \text{ ml}$  に植菌し、 $32^\circ\text{C}$  で一晩振盪培養した。これを種菌としてその  $100 \mu\text{l}$  を生産培地（ポリペプトン 1.5%、酵母エキス 0.5%、リジン-HCl 2.0%、pH 無調整） $25 \text{ ml}$  に植菌し、 $32^\circ\text{C}$  で 24 時間、48 時間、72 時間それぞれ振盪培養した。この培養液の上清中のホモグルタミン酸量を HPLC で測定した。すなわち培養液をアミノ酸総濃度で  $1000 \text{ mg}/\text{L}$  程度になるよう蒸留水で希釈し、 $50 \mu\text{l}$  を試験管に移し減圧乾固した。ここにフェニルイソチオシアネートとトリエチルアミンとエタノールと蒸留水を 1 対 1 対 7 対 2 で混合した溶液を  $50 \mu\text{l}$  加え、攪拌溶解、10 分間室温においた後減圧乾固した。これ HPLC の移動相 A 溶液  $500 \mu\text{l}$  に溶解、 $5 \mu\text{l}$  をインジェクトした。HPLC 条件を下記に示した。

## 【0057】

カラム：TSK-GEL super-ODS 4.6 ID  $\times$  50 mm

移動相：A 溶液 140 mM 酢酸ナトリウム-0.05% トリエチルアミンを氷酢酸で pH を 6.2 に調整した溶液 1000 対アセト

## ニトリル40

B溶液 70%アセトニトリル

流速: 2.0 ml/min

溶出条件: 流速一定のグラジエント、0分から7分までB溶液2%から40%  
へのリニアグラジエント、7分以降B溶液100%

検出: UV 254 nm

温度: 40℃

この条件でホモグルタミン酸の保持時間は1.3 min、リジンは7.7 minであった。

## 【0058】

この結果図4に示したように野生型 pCF213 株は野生型 pCF704 株の1.5倍のホモグルタミン酸生産能を有する。

## 【0059】

6. pCF213 インサート領域の遺伝子塩基配列の決定

pCF213 インサート領域について ABIPRISM 377XL DNA Sequencer (Perkin Elmer 社) を用いプライマーウォーキング法により塩基配列を決定した。この塩基配列を配列番号: 2 に示した。

## 【0060】

決定された塩基配列をもとに Bibb らの方法 (Gene, 30, 157 (1984)) に従ってオープンリーディングフレーム (ORF) を調べた。その結果図5に示したORFを見いだした。

## 【0061】

7. pCF213 インサート領域のNot I 部位約2.5 Kbpの解析

pCF213 インサート領域のうち制限酵素Not I 部位約2.5 Kbp (配列番号: 2の塩基配列2077-4578位) について解析を行った。このNot I 部位約2.5 Kbpをアガロースゲルから切り出し、ウルトラフリーC3ユニット0.45 μm (ミリポア社) を用いてDNAを回収精製しTE溶液に溶解し、DNA Blunting Kit (TaKaRa 社) に従って末端を平滑化したものをインサートDNA溶液とした。一方、pCF704を制限酵素Hinc IIで消化し、アル

カリ性ホスファターゼで脱リン酸化した。これとインサートDNA溶液とを Ligation Kit version 1 (TaKaRa 社) を用いて連結反応した。この反応液で *F. lutescens* IFO3084 株を形質転換して得た形質転換株から、QIAGEN Plasmid Midi Kit を用いてプラスミド pCF235 を調製した。

## 【0062】

pCF235 で形質転換した第一変異株をスクリーニング培地 3 ml に植菌し、32℃で二日間振盪培養した。この培養液 3  $\mu$  l をシリカゲル TLC プレートの各レーンに滴下し乾燥させた。このプレートをブタノール:酢酸:水 (3:1:1) からなる溶媒系で展開し、ニンヒドリン発色して各レーン毎にホモグルタミン酸の有無を調べた。この結果 pCF235 で形質転換した第一変異株はホモグルタミン酸生産能を回復した。

## 【0063】

なお、pCF235 に組み込んだ DNA 配列約 2.5 Kbp には、配列番号: 2 の塩基配列 2855 番目の ATG から始まり 4387 番目の TAA で終わる 510 アミノ酸をコードする ORF が存在した。このアミノ酸配列を BLAST によるホモロジーサーチにかけた結果、種々のアルデヒドデヒドロゲナーゼと高い相同性を示し、さらに最近データベースに登録された *Streptomyces dlavuligerus* のピペリジン-6-カルボン酸デヒドロゲナーゼのアミノ酸配列 (J. Bac., Vol. 180, No.17, 4753-4756 (1998)) と全域にわたり高い相同性を示した。pCF235 で形質転換した第一変異株がホモグルタミン酸生産能を回復したこと、および野生型 pCF213 株のホモグルタミン酸生産能が向上したことを考え合わせると、この ORF がコードする蛋白質はピペリジン-6-カルボン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するものとみなせる。

## 【0064】

実施例 2: LAT 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子のクローニング等

## 1. LAT 活性測定

リジン-HCl 73 mg、2-ケトグルタル酸 59 mg を、0.5 mM ピリドキサル リン酸を含む 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.3) 1 ml に溶かし

、これを反応溶液とした。酵素溶液  $260\mu\text{l}$  に反応溶液  $28.75\mu\text{l}$  を加え、 $32^{\circ}\text{C}$  に1時間置いた。エタノールに溶かした5%トリクロロ酢酸  $151.8\mu\text{l}$  を加えて反応を止め、それを遠心した上清  $60\mu\text{l}$  に  $4\text{mM}$  オーアミノペンズアルデヒドを含む  $0.2\text{M}$  リン酸緩衝液 ( $\text{pH}7.3$ )  $90\mu\text{l}$  を加え  $7^{\circ}\text{C}$  に1時間置いた。これのA465を測定し、相対的にA465が高いフラクションをLAT活性画分とした。

#### 【0065】

#### 2. 菌株の培養

F. lutescens IFO3084株を  $32^{\circ}\text{C}$  で一晩振盪培養した。これを種菌としてその  $50\text{ml}$  を301ジャーのflavo-M9培地 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.6%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.1%、 $\text{NaCl}$  0.2%、ポリペプトン1.0%、酵母エキス0.5%、リジン-HCl 0.5%、シリコーンKM75 0.005%、 $\text{MgSO}_4$  0.025%、 $\text{CaCl}_2$  0.0015%、 $\text{pH}7.2$ )  $10\text{L}$  に植菌し、17時間通気攪拌培養した。得られた培養液  $5\text{L}$  を遠心分離 ( $1000\times g$ 、10分間) して菌体を集め、 $0.01\text{M}$  リン酸緩衝液 ( $\text{pH}7.2$ ) で2回洗浄した。これを同緩衝液に懸濁し、菌体を超音波破碎した。遠心分離 ( $1000\times g$ 、10分間) により菌体破碎物を除き、細胞抽出液を得た。これを超遠心処理 ( $16,000\times g$ 、90分間) してその上清画分を以下に述べる精製操作に供した。

#### 【0066】

#### 3. 酵素の精製

以下に示す精製操作は、特に断らない限り、全て  $4^{\circ}\text{C}$  にて行った。

##### (1) 硫酸アンモニウム分画

実施例1で得た上清画分  $600\text{ml}$  を硫酸アンモニウム沈殿により精製した。 $30\%$  飽和から  $80\%$  飽和の画分にて生じた沈殿を遠心分離 ( $1,000\times g$ 、30分間) して集め、 $0.01\text{M}$  リン酸緩衝液 ( $\text{pH}7.2$ ) に溶解し、同緩衝液に対して透析した。

##### (2) 脱塩

透析した酵素溶液  $10\text{ml}$  をPD10カラム (Amasham Pharmacia) 4本に付



し0.5mMピリドキサルリン酸を含む0.1M Tris-HCl緩衝液(pH7.4)で溶出し、脱塩した。

(3) QAE-TOYOPEAL550Cカラムクロマトグラフィー

脱塩した酵素溶液を予め0.5mMピリドキサルリン酸を含む0.1M Tris-HCl緩衝液(pH7.4)で平衡化したQAE-TOYOPEAL550C(TOSOH)カラム( $\phi$ 5.5×6.0cm)に付した。同緩衝液で洗浄した後、同緩衝液を用いた2lの塩化ナトリウムリニアグラジエント(0~1.0M)で溶出し、LAT活性画分を集めた。

(4) Phenyl-TOYOPERL650Sカラムクロマトグラフィー

LAT活性画分に1M硫酸アンモニウムを加え、これを予め0.5mMピリドキサルリン酸と1M硫酸アンモニウムを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.2)で平衡化したPhenyl-TOYOPERL650S(TOSOH)カラム( $\phi$ 5.5×3.0cm)に付した。同緩衝液を用いた1200mlの硫酸アンモニウムグラジエント(0.8~0M)で溶出し、LAT活性画分を集めた。

(5) 限外ろ過

150mlのLAT活性画分をADVANTEC UP-20で限外ろ過し、15mlとした。この濃縮液2.5mlをPD10カラム(Amasham Pharmacia)に付し0.1M Tris-HCl緩衝液(pH7.4)で溶出、脱塩した。

(6) AKTA MonoQ HR5/5カラムクロマトグラフィー

脱塩した酵素溶液3.5mlを予め0.1M Tris-HCl緩衝液(pH7.4)で平衡化したAKTAexplorer 10SシステムのMonoQ HR5/5カラム(Amasham Pharmacia)に付した。同緩衝液で洗浄した後、同緩衝液を用いた40mlの塩化ナトリウムリニアグラジエント(0~0.4M)で溶出し、LAT活性画分を集めた。さらにこのLAT活性画分5mlをPD10カラムで脱塩し、再度AKTAexplorer 10SシステムのMonoQ HR5/5カラムに付し、LAT活性画分を集めた。各各画分と相対的LAT活性の関係を図6に示す。

(7) 電気泳動

LAT活性画分をマルチゲル4/20および10/20第一化学薬品(株)に付し、Native-PAGEおよびSDS-PAGEを行った結果を図7に示した。LAT活性

画分にはNative-PAGEで分子量100000付近、SDS-PAGEで分子量55000付近のバンドが確認された。このSDS-PAGEで分子量55000付近のバンドをPhastTransfer (Amasham Pharmacia) によりPVDF膜にブロッティングした。

【0067】

#### 4. N末端アミノ酸配列解析

ブロッティングしたバンドのN末端アミノ酸配列解析をHP G1005A Protein Sequencing System (HEWLETT PACKARD) を用いエドマン分解法により行った。この結果N末端アミノ酸配列は  
SLLAPLAPLRAHAGTRLTQG

であることが明らかになった。これに基づいて

NmaRout CCYTGIGTIARICKIGTICCGICRTGIGCICG

NmaRin CCIGCRTGIGCICGIARIGGIGCIARIGGIGC

というDNAプライマーをデザインし、LA PCR in vitro cloning KIT (TaKaRa) を用いて、F. lutescens IFO3084株のゲノムDNAに対してPCRを行った。PCR反応条件は94℃30秒→55℃2分→72℃1分の30サイクルとした。この結果、上記末端とその上流領域を含む約400bpのPCR増幅断片が得られた。このシーケンスをもとにその周辺領域をさらにPCRを用いて取得した。すなわち F. lutescens IFO3084株のゲノムDNAを制限酵素PstIとSalIでそれぞれ消化し、Ligation Kit version 2 (TaKaRa 社) を用いてそれぞれ自己連結反応したものをテンプレートDNAとした。このテンプレートDNAに対し、

NIFout ttgatttgag cagattcgca ctgccattt (配列番号: 3)

NIRout aagggttttcg acaaagtgac catttccca (配列番号: 4)

というDNAプライマーをデザインし、LA Taq (TaKaRa) を用いてPCRを行った。PCR反応条件は98℃20秒→68℃6分の30サイクルとした。この結果PstIテンプレートから約2Kbp、SalIテンプレートから約8KbpのPCR増幅断片が得られた。これらのPCR増幅断片についてABIPRISM 377XL DNA Sequencer (Perkin Elmer社) を用いプライマーウォーキング法により塩基配列を決定した。この塩基配列を配列番号: 1に示す。

## 【0068】

## 5. プラスミド pCF301、pCF335 の構築

配列表：1 の 545 塩基と 2658 塩基の Pst I 部位をそれぞれ Kpn I、Sac I に改変した DNA プライマー

ctggtaccgc tcgatccggc tctgcaccgt (配列番号：5)

ctggagctca ggcaggtgcg ggccacgtgt (配列番号：6)

を作成し、これを用いて PCR 反応を行い lat 遺伝子領域を増幅した。この増幅断片約 2.1 Kbp を制限酵素 Kpn I、Sac I で消化したものをインサート DNA 溶液とした。一方、pCF704 を制限酵素 Kpn I、Sac I で消化し、これとインサート DNA 溶液とを Ligation Kit version 2 (TaKaRa 社) を用いて連結反応したプラスミドを pCF301 とした。さらに pCF301 を制限酵素 Kpn I、Sac I で消化し、その約 2.1 Kbp 断片をアガロースゲルから切り出し、これと pCF235 を制限酵素 Kpn I、Sac I で消化したものとを連結反応したプラスミドを pCF335 とした。

## 【0069】

## 6. プラスミド pCF301 による lat 活性の相補

pCF704 で第二変異株を形質転換した株を 2nd pCF704 株、pCF301 で第二変異株を形質転換した株を 2nd pCF301 株とした。これらの株を 32℃ で一晚振盪培養した。これを種菌としてその 30 μl を遠沈管の生産培地（ポリペプトン 1.5%、酵母エキス 0.5%、リジン-HCl 2.0%、pH 無調整）3 ml に植菌し、17 時間通気攪拌培養した。得られた培養液 1 ml を遠心分離（1000×g、10 分間）して菌体を集め、0.5 mM ピリドキサルリン酸を含む 0.2 M リン酸緩衝液（pH 7.3）10 ml で洗浄した。これを同緩衝液 1 ml に懸濁し、菌体を超音波破碎した。遠心分離（1000×g、10 分間）により菌体破碎物を除き、細胞抽出液を得た。この抽出液の lat 活性を測定した。この結果を図 8 に示す。pCF301 は第二変異株の lat 変異を相補した。

## 【0070】

## 7. pCF335 によるホモグルタミン酸生産能の向上

pCF704で野生型 *F. lutescens* IFO 3084株を形質転換した株を野生型pCF704株、プラスミドpCF301、pCF335で形質転換した株を野生型pCF301株、野生型pCF335株とした。これらの株ををカナマイシン $20\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むスクリーニング培地 $3\text{ml}$ に植菌し、 $32^{\circ}\text{C}$ で一晩振盪培養した。これを種菌としてその $100\mu\text{l}$ を生産培地（ポリペプトン $1.5\%$ 、酵母エキス $0.5\%$ 、リジン-HCl  $2.0\%$ 、pH無調整） $25\text{ml}$ に植菌し、 $32^{\circ}\text{C}$ で24時間、48時間、72時間それぞれ振盪培養した。この培養液の上清中のホモグルタミン酸量をHPLCで測定した。すなわち培養液をアミノ酸総濃度で $1000\text{mg}/\text{L}$ 程度になるよう蒸留水で希釈し、 $50\mu\text{l}$ を試験管に移し減圧乾固した。ここにフェニルイソチオシアネートとトリエチルアミンとエタノールと蒸留水を1対1対7対2で混合した溶液を $50\mu\text{l}$ 加え、攪拌溶解、10分間室温においた後減圧乾固した。これHPLCの移動相A溶液 $500\mu\text{l}$ に溶解、 $5\mu\text{l}$ をインジェクトした。HPLC条件は、実施例1の5に記載したとおりである。

【0071】

この結果、図9に示すように野生型pCF335株は野生型pCF704株の約2倍のホモグルタミン酸生産能を有していた。

【0072】

【配列表】

<110> Mercian Corporation

<120> ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子およびその使用

<130>

<150> JP10/232382

<151> 1998-8-5

<160> 6

<210> 1

<211> 2663

<212> DNA

<213> *Flavobacterium lutescens*

<220>

<221> CDS

<222> (801)---(2276)

<400> 1

```

cccgggtgtc attgaatacc agcaggtcgc caggttgcag cagctgggtcc agatcgcgca    60
cctggcgatc ctccagcgca gccggtgccg gcggcaccag cagcaggcgg ctggccgaac    120
gctccggcag cggcgcctgg gcaatcagtt cgggaggcag gtggtaggca aaatcggact    180
tcttcaacgc cggcagctcg atacaacggg ggcgtcagtt tacgcccctg taccgcctgt    240
gccccacccg ctggaacttg gtgcccagga tcaccgccgt ggtgggtgcgc tcgaccccat    300
cagtggcgcc gatggcatcg gtcagctcgt ccatcgccgc cagcccatcg acggcggcca    360
tcgccaccag gtcatgcgcg ccactgaccg aatgcaggct gcgcaccgca gcaatggcct    420
gcagcgcccc cagcaccgcc ggcattttct tcggcatcac ggtgatggag atatgcgcgc    480
ggacctgctg gcgctccatc gcctggccaa ggcgcacggt gtagccggcg attattccgc    540
tgtgctgcag ccgctcgatc cggctctgca ccgtgggtccg cgacaccccc agccggcgcg    600
ccagcgccgc ggtcgaggcg cgcgcattct cagcaacag gtcaagcaac tgtgcatccg    660
cctgggaaat ggtcactttg tcgaaaacct ttcgtcaatc cgccgaaacc ggccattgat    720
ttgagcagat tcgcactgcc attttagtg cgtaaagggt tacaactaac actagacaca    780
atcagcacgg attcagcatg tcc ctt ctt gcc ccg ctc gcc ccg ctc cgc gcc    833

```

Ser Leu Leu Ala Pro Leu Ala Pro Leu Arg Ala

1 5 10

```

cat gcc ggc acc cgc ctt acc cag ggc ctg tct gac ccg cag gtc gag    881

```

His Ala Gly Thr Arg Leu Thr Gln Gly Leu Ser Asp Pro Gln Val Glu

15 20 25

```

cag ctg gcc gcc aac cac cct gac ctg cgc gcc gcc atc gac gcc gct    929

```

Gln Leu Ala Ala Asn His Pro Asp Leu Arg Ala Ala Ile Asp Ala Ala

30 35 40

```

gcc gac gaa tac gcg cgc atc aaa ccg cag gcc gcg gca ttg ctg gac    977

```

Ala Asp Glu Tyr Ala Arg Ile Lys Pro Gln Ala Ala Ala Leu Leu Asp

45 50 55

ctg gat gaa agc gcg cag atc gcc gcc gtg cag gat ggc ttc gtc aac	1025
Leu Asp Glu Ser Ala Gln Ile Ala Ala Val Gln Asp Gly Phe Val Asn	
60                                  65                                  70                                  75	
ttc tat gcc gat gat gcg gtg gtg ccc tat atc gcc ctg gcc gcc cgc	1073
Phe Tyr Ala Asp Asp Ala Val Val Pro Tyr Ile Ala Leu Ala Ala Arg	
80                                  85                                  90	
ggg ccg tgg gtg gtc agc ctg aag ggc gcg gtg ctg tat gac gcc ggc	1121
Gly Pro Trp Val Val Ser Leu Lys Gly Ala Val Leu Tyr Asp Ala Gly	
95                                  100                                  105	
ggc tac ggc atg ctc ggc ttc ggc cat acc ccg gcc gat atc ctg gag	1169
Gly Tyr Gly Met Leu Gly Phe Gly His Thr Pro Ala Asp Ile Leu Glu	
110                                  115                                  120	
gcg gtc ggc aag ccg cag gtg atg gcc aac atc atg act ccc tcg ctg	1217
Ala Val Gly Lys Pro Gln Val Met Ala Asn Ile Met Thr Pro Ser Leu	
125                                  130                                  135	
gcc cag ggc cgc ttc att gcc gca atg cgc cgc gaa atc ggc cat acc	1265
Ala Gln Gly Arg Phe Ile Ala Ala Met Arg Arg Glu Ile Gly His Thr	
140                                  145                                  150                                  155	
cgc ggc ggc tgc ccg ttc tcg cac ttc atg tgc ctg aac tcc ggc tcc	1313
Arg Gly Gly Cys Pro Phe Ser His Phe Met Cys Leu Asn Ser Gly Ser	
160                                  165                                  170	
gaa gcg gtc ggg ctg gcc gcg cgc atc gcc gac atc aac gcc aag ctg	1361
Glu Ala Val Gly Leu Ala Ala Arg Ile Ala Asp Ile Asn Ala Lys Leu	
175                                  180                                  185	
atg acc gac ccg ggc gcc cgg cat gcc ggc gcc acg atc aag cgc gtg	1409
Met Thr Asp Pro Gly Ala Arg His Ala Gly Ala Thr Ile Lys Arg Val	
190                                  195                                  200	
gtg atc aag ggc agt ttc cac ggc cgt acc gac cgt ccg gcg ctg tat	1457
Val Ile Lys Gly Ser Phe His Gly Arg Thr Asp Arg Pro Ala Leu Tyr	

205	210	215	
tcc gat tcc acc cgc aag gcc tac gat gcg cat ctg gcc agc tac cgc			1505
Ser Asp Ser Thr Arg Lys Ala Tyr Asp Ala His Leu Ala Ser Tyr Arg			
220	225	230	235
gac gag cac agc gtc att gcc atc gcc ccg tat gac cag cag gcc ctg			1553
Asp Glu His Ser Val Ile Ala Ile Ala Pro Tyr Asp Gln Gln Ala Leu			
240	245	250	
cgc cag gtg ttt gcc gat gcc cag gcc aac cac tgg ttc atc gag gcg			1601
Arg Gln Val Phe Ala Asp Ala Gln Ala Asn His Trp Phe Ile Glu Ala			
255	260	265	
gtg ttc ctg gag ccg gtg atg ggc gaa ggc gac ccg ggc cgt gcg gtg			1649
Val Phe Leu Glu Pro Val Met Gly Glu Gly Asp Pro Gly Arg Ala Val			
270	275	280	
ccg gtg gac ttc tac cgc ctg gcc cgt gag ctg acc cgc gaa cac ggc			1697
Pro Val Asp Phe Tyr Arg Leu Ala Arg Glu Leu Thr Arg Glu His Gly			
285	290	295	
agc ctg ctg ctg atc gat tcg atc cag gcc gcg ctg cgc gtg cac ggc			1745
Ser Leu Leu Leu Ile Asp Ser Ile Gln Ala Ala Leu Arg Val His Gly			
300	305	310	315
acc ctg tcc ttc gtc gac tac ccc ggc cac cag gag ctg gag gca ccg			1793
Thr Leu Ser Phe Val Asp Tyr Pro Gly His Gln Glu Leu Glu Ala Pro			
320	325	330	
gac atg gag acc tac tcc aag gcc ctg aac ggc gcc cag ttc ccg ctg			1841
Asp Met Glu Thr Tyr Ser Lys Ala Leu Asn Gly Ala Gln Phe Pro Leu			
335	340	345	
tcg gta gtg gcc gtg acc gag cac gcc gcc gcg ctg tac cgc aag ggc			1889
Ser Val Val Ala Val Thr Glu His Ala Ala Ala Leu Tyr Arg Lys Gly			
350	355	360	
gtg tac ggc aac acc atg acc acc aac ccg cgg gcg ctg gac gtg gcc			1937

Val Tyr Gly Asn Thr Met Thr Thr Asn Pro Arg Ala Leu Asp Val Ala  
 365 370 375  
 tgc gcc acc ctg gca cgc ctg gat gag ccg gtc cgc aac aat atc cgc 1985  
 Cys Ala Thr Leu Ala Arg Leu Asp Glu Pro Val Arg Asn Asn Ile Arg  
 380 385 390 395  
 ctg cgt ggc cag cag gcg atg cag aag ctg gaa gca ttg aag gaa cgg 2033  
 Leu Arg Gly Gln Gln Ala Met Gln Lys Leu Glu Ala Leu Lys Glu Arg  
 400 405 410  
 ctg ggg ggc gcg atc acc aag gtg cag ggc acc ggc ctg ctg ttc tcc 2081  
 Leu Gly Gly Ala Ile Thr Lys Val Gln Gly Thr Gly Leu Leu Phe Ser  
 415 420 425  
 tgc gag ctg gcc ccg cag tac aag tgc tac ggg gcc ggc tcc acc gag 2129  
 Cys Glu Leu Ala Pro Gln Tyr Lys Cys Tyr Gly Ala Gly Ser Thr Glu  
 430 435 440  
 gag tgg ctg cgc atg cac ggg gtc aat gtg atc cac ggc ggc gag aat 2177  
 Glu Trp Leu Arg Met His Gly Val Asn Val Ile His Gly Gly Glu Asn  
 445 450 455  
 tcg ctg cgc ttc acc ccg cac ttc ggc atg gac gag gcc gaa ctg gac 2225  
 Ser Leu Arg Phe Thr Pro His Phe Gly Met Asp Glu Ala Glu Leu Asp  
 460 465 470 475  
 ctg ctg gtg gag atg gtc ggg cgt gcg ctg gtc gaa ggc cca cgc cgg 2273  
 Leu Leu Val Glu Met Val Gly Arg Ala Leu Val Glu Gly Pro Arg Arg  
 480 485 490  
 gcc tga tccgcacccg caggacggaa ggcacgagcc caccgtgagg cgggctcttt gc 2331  
 Ala Stop  
 tgcccggcac cagcggcaac aggccgcgct gtcaccggcc aggcggggcg ccggcagtgg 2391  
 gtttcagccg caggggtccg ccctgccagc gcctgcggcg gggcacaggc ttgcgggcat 2451  
 tgcggcctct gccacgggca cgcagccgga gatcaggctg acaagggggc tgcccgggt 2511  
 ggcagtacac gaccagccag ttgactgccg gtatttgctt gatcagcgct gcatccagaa 2571



cagcaccatc ggttgctga ctgacgcgc gctggccgtt gcgggacagc agcctttgcg 2631  
tcacacgtgg cccgcacctg cctgcactgc ag 2663

<210> 2

<211> 6357

<212> DNA

<213> Flavobacterium lutescens

<220>

<221> CDS

<222> (2855)---(4387)

<400> 2

ggatcgggcc actgggctca ctgctggacg caatccgagt gccgggatgg ctggggttga 60  
aggtgttgcg gatcacgac ggcatctgcc gggcgatggc cgggctcatc gtctgcgggt 120  
gcaccacctt ggcgccgaaa taggccagtt cgcaggcctc gtcatactg agcgtggcca 180  
gggtcaccgc ctggggcacc acccgcggtt cggccgacag cacaccgtcg acatcggtcc 240  
agatgtgcag ctgggccgcc tcgaacagcg cggcaaagat cggcccgga taatcgctgc 300  
cgttgcggcc cagggttggtg atcctgccct ggccatcacg ggcgacaaaa ccggtgacca 360  
ccaccgcga ctgcggttg tccacacgcc aggcggccag gtggccgca ctgcgttccc 420  
agtcgacgtt gacccccagc tcgccgtgtg cgaccaccag cacatcgcg gcacgagca 480  
ccgcgcaggg gtggccgagc cgggtgaaat agcgggccag cagctgggcc gagaacacct 540  
cgcccagccc ctgcaccctt tcaagcacct cctcgggcag gccgccgatc accgccagcg 600  
cttcagcaa cccggccagc ttgtcaaagc gtccatccag cactgcagc aggtcggcag 660  
aatcctcgcc cagcagttcg gtggccgctt catggtggcg ctggcgagg gcctgccagg 720  
catcacgcca gcgcggctga ccgtgggcgg ccagggtagc cagctcgatc aaggcatcgg 780  
tgacaccctt catcgccgag accaccacca cctgggtggg ttccgggcgc tgcagcagca 840  
actcggcgac atggcggtag cgctgcgccg aggccaccga ggtgccgccg aacttgtggg 900  
cgatgacctg ggcatcgggc gcgggagcgg gagcgggtgc agcggcaggc gatgacatca 960  
caacagacct ctggggttga ggcccggcac cgcaggttgc gaagtcccgc aacctggtcg 1020  
gtgcggggcc gttgttttcg ggggttagac gaatacgacg ggccgcacca gccaagtggg 1080  
ggtggtaatg atggtcatgc cggtagcgcc agcaggcgcc agcagggcgg cagtggaaatc 1140

aacggtggcg cggcagatcg acatgcagcg agcagaccgc acagcgctg ctgctgtcaa 1200  
 ctgttgatt gcaaaataat ttccgcgca tcatcgcgga acatgcaccg atttggttgc 1260  
 aaatgtgatc gtcagcgatc ttctgtcaaa acccgcgat caagcggcca cagccgctgc 1320  
 ggcagccgcg gaccaccgcg cgccgatgcc agcgccgggc ggcagagcaa gccgccagcg 1380  
 caaccggcca ttaccgcggc caggcgccgg gcctgcgcgg ctcaaccgtg gattttttcc 1440  
 cagcgggctt gggcctgcgc ggccagcacc accccgccga ccaacagcgc aatggccagc 1500  
 agtccagca gggtcgggccc acgtgctgc cagatgaagc cataaagcaa cgcgaacagg 1560  
 gtttcaaaca cgatcagctg cccgcccagg ctacgcggca ggctgcgcgt ggcccggttc 1620  
 cagcaggcat tgcccagcac cgaggcaccg acggccagca gcgcacagat gccggcaaag 1680  
 tgcagccact ggccctggct ctgcccagac ggcccagcc acagcgccag cggcagcaac 1740  
 agcacggcga tggcccctgt ggccaccccg gtcaacaacg accaggcatg cccggacagg 1800  
 tgcggatagc gccgcattca caccacattg gcgatcgagt agccactcca ggccggccagc 1860  
 gcggccagcg cgcagagcag gccagcacc cgctgaccga tgccttggc agcatcgccc 1920  
 gccgcgcccg cgccgtggcc gagtgcagcc caggccacca gcagcgagcc cagcacacac 1980  
 aggcacagcg ccggtgccag ctgacgcaac ggcagggccg ttggccgccc cgcatccacc 2040  
 gccgccacca ccaccggcac catgcccacg atcagcgccg ccgccgcacc gccagcccag 2100  
 tgcacggcca tcgccagaaa cacgaaatag accaggttgc cgagcaggct cagcccggcc 2160  
 agggccagcc aggcgcggcg atcgacctgc gcacgcagcg ccggccacaa cggcagcagc 2220  
 aacgcacagg ccaccgcacc gtacagcagg tagcggccca cggccagctg cagcgcagaa 2280  
 aatgcggttg tcaaggccgg cgccaggaac accatgcccc acagggcacc ggcgagcagc 2340  
 ccgttgaaca gtccccacgc ggtctggttg ttgcgctgga tcacgtgca aggccctgca 2400  
 atgaacaaca ggccggggcg gcgcagcgca tgggcgctgg cagctctccg acctgtgcaa 2460  
 aggtggtggc cccgacacga ttcaacgtg cgacctgtcc cttaggaggg gaccgctcta 2520  
 tccagctgag ctacggagcc atgaggccgg cgattctagc atccgctctc cgttcacggc 2580  
 catgccccgc agccgcagtt cacagtgcag ggcaaccgca gcaagcccc gccccgctgc 2640  
 aaccctcgcg ccgcgcgca acgtgaccgg cgccgcggca ggcccggccc ccacggccac 2700  
 tggcgccgtt tccgaccac gccaccggca acacgcccc agccctgccc aacgtggtgt 2760  
 ttcagcgctc tgtaagatg gcatgcccac atgccacctc cccccggacg cgccgcgggt 2820  
 gcgtgacctt ttcgtaacgt aatctggagt ttcc atg tcg ttt gaa ctg ctc aag 2875

Met Ser Phe Glu Leu Leu Lys

1

5

gcc tta ggg ctg gac gcc acc aat tcc ggc acc tac ctg ggt gat gga	2923
Ala Leu Gly Leu Asp Ala Thr Asn Ser Gly Thr Tyr Leu Gly Asp Gly	
10 15 20	
gaa tgg tcc agc gct acc ggt gcc ggg acc atc agc ccg cgc aac ccg	2971
Glu Trp Ser Ser Ala Thr Gly Ala Gly Thr Ile Ser Pro Arg Asn Pro	
25 30 35	
acc acc ggc gag gtc att gcc cag gtc cag gcc acc acc gag gcg gac	3019
Thr Thr Gly Glu Val Ile Ala Gln Val Gln Ala Thr Thr Glu Ala Asp	
40 45 50 55	
tac gaa acc atc ctg gcc cgc gcc cag cag gcc ttc aag gtc tgg cgc	3067
Tyr Glu Thr Ile Leu Ala Arg Ala Gln Gln Ala Phe Lys Val Trp Arg	
60 65 70	
acc acc ccg gca ccg cgc cgc ggc gag gcc atc cgc ctg tgt ggc gag	3115
Thr Thr Pro Ala Pro Arg Arg Gly Glu Ala Ile Arg Leu Cys Gly Glu	
75 80 85	
gcc ctg cgc cgc cac aag gac gcg ctg ggt tcc ctg gtc gcg ctg gaa	3163
Ala Leu Arg Arg His Lys Asp Ala Leu Gly Ser Leu Val Ala Leu Glu	
90 95 100	
atg ggc aag tcc aag ccg gaa ggc gac ggc gaa gtc cag gaa atg atc	3211
Met Gly Lys Ser Lys Pro Glu Gly Asp Gly Glu Val Gln Glu Met Ile	
105 110 115	
gac atc gcc gac ttt gcc gtc ggc cag agc cgc atg ctg tat ggc tac	3259
Asp Ile Ala Asp Phe Ala Val Gly Gln Ser Arg Met Leu Tyr Gly Tyr	
120 125 130 135	
acc atg cac agc gag cgc ccc ggc cac cgc atg tac gag cag tac cag	3307
Thr Met His Ser Glu Arg Pro Gly His Arg Met Tyr Glu Gln Tyr Gln	

140	145	150	
ccg ctg ggc atc gtc ggc atc atc tgc gcc ttc aac ttc ccg gtc ggc			3355
Pro Leu Gly Ile Val Gly Ile Ile Ser Ala Phe Asn Phe Pro Val Ala			
155	160	165	
gtc tgg gcc tgg aac agc ttc ctg gcc ggc atc tgt ggt gat gtc tgc			3403
Val Trp Ala Trp Asn Ser Phe Leu Ala Ala Ile Cys Gly Asp Val Cys			
170	175	180	
atc tgg aag ccg tcc aac aag acc ccg ctg acc ggc atc ggc tcc atg			3451
Ile Trp Lys Pro Ser Asn Lys Thr Pro Leu Thr Ala Ile Ala Ser Met			
185	190	195	
cgc atc tgc aac gaa gca ctg cgc gaa ggc ggc ttc ccg gac atc ttc			3499
Arg Ile Cys Asn Glu Ala Leu Arg Glu Gly Gly Phe Pro Asp Ile Phe			
200	205	210	215
ttc ctg atc aac gac gcc ggc acc ggc ttg tgc gag aag ctg gtc gag			3547
Phe Leu Ile Asn Asp Ala Gly Thr Ala Leu Ser Glu Lys Leu Val Glu			
220	225	230	
gac aag cgc gtg ccg ctg atc tcc ttc acc ggc tgc acc cag gtc ggc			3595
Asp Lys Arg Val Pro Leu Ile Ser Phe Thr Gly Ser Thr Gln Val Gly			
235	240	245	
cgc atc gtc aac cag aag gtc gcc gcc cgc ctg ggc cgc tgc ctg ctc			3643
Arg Ile Val Asn Gln Lys Val Ala Ala Arg Leu Gly Arg Cys Leu Leu			
250	255	260	
gag ctg ggc ggc aac aac ggc atc atc ctg gac gaa acc gcc gac ctg			3691
Glu Leu Gly Gly Asn Asn Ala Ile Ile Leu Asp Glu Thr Ala Asp Leu			
265	270	275	
aag ctg gcc gtg ccg ggc atc gtc ttc ggc gcc gtc ggc acc gcc ggc			3739
Lys Leu Ala Val Pro Gly Ile Val Phe Gly Ala Val Gly Thr Ala Gly			
280	285	290	295
cag cgc tgc acc acc acc cgc cgc ctg atc gtg cac gaa tgc atc tac			3787

Gln Arg Cys Thr Thr Thr Arg Arg Leu Ile Val His Glu Ser Ile Tyr	
300 305 310	
gac aac gtg ctg gcc acc ttg atc aag gcc tac aag cag gtc gaa ggc	3835
Asp Asn Val Leu Ala Thr Leu Ile Lys Ala Tyr Lys Gln Val Glu Gly	
315 320 325	
aag atc ggc gat ccg ctg gat gcc gcc aac ctg atg ggc ccg ctc aac	3883
Lys Ile Gly Asp Pro Leu Asp Ala Ala Asn Leu Met Gly Pro Leu Asn	
330 335 340	
agc ccc gaa gcg gtg cag cag ttc ctg gcc tcg atc gag aaa gcc aag	3931
Ser Pro Glu Ala Val Gln Gln Phe Leu Ala Ser Ile Glu Lys Ala Lys	
345 350 355	
gcc gct ggc ggc acc gtt caa acc ggt ggt acc gcg atc gac cgc ccg	3979
Ala Ala Gly Gly Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr Ala Ile Asp Arg Pro	
360 365 370 375	
ggc aac ttc gtg ctg ccg gcc atc gtc acc ggc ctg aag aac agc gat	4027
Gly Asn Phe Val Leu Pro Ala Ile Val Thr Gly Leu Lys Asn Ser Asp	
380 385 390	
gag gtg gtc cag cac gag acc ttc gcc ccg atc ctg tac gta atg aag	4075
Glu Val Val Gln His Glu Thr Phe Ala Pro Ile Leu Tyr Val Met Lys	
395 400 405	
tac tcc acc ctg gac gaa gcc atc gag atg cag aac ggc gtg ccg cag	4123
Tyr Ser Thr Leu Asp Glu Ala Ile Glu Met Gln Asn Gly Val Pro Gln	
410 415 420	
ggc ctg tcc tcg tcg atc ttc acc acg aac ctg aag gca gcc gag aag	4171
Gly Leu Ser Ser Ser Ile Phe Thr Thr Asn Leu Lys Ala Ala Glu Lys	
425 430 435	
ttc ctg tcg gcg gcc ggc agc gac tgc ggc att gcc aac gtc aac atc	4219
Phe Leu Ser Ala Ala Gly Ser Asp Cys Gly Ile Ala Asn Val Asn Ile	
440 445 450 455	

ggc act tcc ggt gcc gag atc ggc ggc gcc ttc ggt ggc gag aag gaa 4267  
 Gly Thr Ser Gly Ala Glu Ile Gly Gly Ala Phe Gly Gly Glu Lys Glu  
 460 465 470  
 acc ggc ggt ggc cgt gag tcc ggc tgc gat gcg tgg aag gtc tac atg 4315  
 Thr Gly Gly Gly Arg Glu Ser Gly Ser Asp Ala Trp Lys Val Tyr Met  
 475 480 485  
 cgc cgc cag acc aac acc atc aac tac tcc gac tgc ctg ccg ctg gcc 4363  
 Arg Arg Gln Thr Asn Thr Ile Asn Tyr Ser Asp Ser Leu Pro Leu Ala  
 490 495 500  
 cag ggc atc aag ttc gac ctg taa gccgctcgcc acggcccgcc ttccccggaa 4417  
 Gln Gly Ile Lys Phe Asp Leu Stop  
 505 510  
 gcaggccgtg gctgtttgcac cagccagagg agtgactgca tgactgcaat tgaatcgact 4477  
 gccgcacgca ccaccaaacac ttgcgccatc ctgtcgtctg tactggcact gctgggctgg 4537  
 aatcttttgc cgggtgattgg ctttgtcggc gccatcatct gcggccgcat cgcgcagcgc 4597  
 cagctcaagc agcccggcaa taccaggac ggtcacggcc tggcaagggc gggcatcttg 4657  
 atcagttgga tcagcctgat cctggttgcg ctgctgatcg gcgtcgtgat cccgtggttg 4717  
 accgccccga tcacgatcaa cctgcccgtt tccacctgac cctcctccct gccagtcgcc 4777  
 catgcgctga caggccaacc cgtttcctgc ctggaccaga ccatgctccc gcccgacct 4837  
 ccggctccac catcgcccat tgccggcacc acaacctga ccaatggcta tgcggtggcc 4897  
 tcgctggtga tgggcatcct tggctggtcg atgatccgc tgttgggcag catcggcgcc 4957  
 atcgtgttcg ggcatctggc ccgggcgcag atccgtcgcc agccccagca gggcgatggc 5017  
 ctggcactgg ccgggctgat cctgggctgg atctcgattg cgctgttgat cctcgggata 5077  
 ctggcgtttt tctcttctt tggcgggctg gccatgctgc tcagcctgaa cgctgacct 5137  
 gagccttgcc gtatgtattc cctgctccgt cccgccctgt tctgcatgga tgccgagcgc 5197  
 gcccatggcg ccggcctgcg cgccctggat ctgcctacc gcagcggtac gctggggctg 5257  
 ctggccagcc ggccagcacc gttccaacc cgcgctttcg gccctggaatt cccaacccg 5317  
 gtgggcctgg ccggccggcct ggacaagaac ggcgagcata tcgatgcact gttcgcgctg 5377  
 ggctttggct atgtcgaaat cggcacggtg accccgcgcc cgcaggccgg caatccgcag 5437

ccacggctgt tccgcgtgcc cgagcacctg ggcgtgatca accgcatggg tttcaacaat 5497  
 gccggcgtcg atgcgctggt ggccaatgtg cgcgcggcac ggcgtgaccg cggcattcctc 5557  
 ggcatcaaca tcggcaagaa caaggacacc cccaacgagc tggcccatac cgattacctg 5617  
 acctgcctgg aaaaggtgta cgcgctggcc gactacatca ccgtcaacat ctctcgtccc 5677  
 aacaccgccg ggctgcgcga gctgcaggaa gaacaggccc tgcgcgagct ggtcagccgc 5737  
 ctgcgcgagg gccaggaaac cctggccgca cgccatggca agcgggtgcc gatgctggtc 5797  
 aaggtcgcgc cggacctgag cgatgccgat gtcgatgccg ccgcccgtgt gctggcagag 5857  
 ctgcaggtgg acggggtgat cgccaccaac accaccatcg cgcgcgtggg catggaaaac 5917  
 caccactgg ccagcgaggc cggcggcctg tccggggcac cggatgatggc gcgctccacc 5977  
 gcggtgctgc gccgcctgcg caccggctg ccggagtcga tcccgtgat cggcgtcggc 6037  
 ggcatctgtt ccggggctga tgcggcggcc aagatgagtg ccggcgcgac catggtgcag 6097  
 ctctacagcg ggctggttta ccgcggcccg gactggtcg gcgaatgcgt cgaatcgatc 6157  
 cgccgccggc gcgaagcgcc ctccagcggg gtagccatc tgtgagtacg ccgggctggc 6217  
 agctgcacca cgatgtcgca ctgcaatcaa tgaacacctt cggggtagcg gccaccgcgc 6277  
 cgcgcctgct gcgcgtgcac gacagccagg ccctgccggc ggcgctggcg caccgggaag 6337  
 tagccggaca gccgttgatc 6357

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> N-末端アミノ酸配列情報からLAPCR in vitro cloning KITにより得られたPCR増幅断片約400bpの塩基配列を参考にして合成

<400> 3

ttgatttgag cagattcgca ctgccattt 29

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> N-末端アミノ酸配列情報からLAPCR in vitro cloning KITにより得られたPCR増幅断片約400bpの塩基配列を参考にして合成

<400> 4

aaggttttcg acaaagtgac catttccca

29

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 配列表1:の545塩基と2658塩基のPstI部位をそれぞれKpnI、SacIに改変した配列を参考にして合成

<400> 5

ctggtaccgc tcgatccggc tctgcaccgt

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 配列表1:の545塩基と2658塩基のPstI部位をそれぞれKpnI、SacIに改変した配列を参考にして合成

<400> 6

ctggagctca ggcaggtgcg ggccacgtgt

30

【図面の簡単な説明】

【図1】

F. lutescens の変異株によるホモグルタミン酸生産の薄層クロマトグラフィーによる分析結果。Stは、標準のホモグルタミン酸であり、レーン1～4は第一変異株、レーン5～7は第二変異株、レーン8～10は第三変異株、レーン11は野生型株、レーン12および13はプラスミドpCF704を有



する第一変異株の分析結果を、それぞれ示す。

【図 2】

F. lutescens の変異株のリジン 6-アミノトランスフェラーゼ (LAT) 活性を示すグラフである。Wild は野生型株、1st は第一変異株、2nd は第二変異株、3rd は第三変異株の LAT 活性を示す。

【図 3】

プラスミド pCF213 によるホモグルタミン酸生産性欠損変異株のホモグルタミン酸生産性の相補性を示す薄層クロマトグラフィーによる分析の結果を示す。

HG はホモグルタミン酸の移動位置を、Lys は L-リジンの移動位置を示し、そして St はホモグルタミン酸標準物質の、1st pCF213、2nd pCF213 および 3rd pCF213 は、それぞれ pCF213 を有する第一、第二および第三変異株の培養物の、Wild pCF213 および Wild pCF704 は、それぞれ pCF213 および pCF704 を有する野生型株の培養物の、1st pCF704 および 2nd pCF704 は、それぞれ pCF704 を有する第一および第二変異株の培養物の、ならびに 1st pCF111 は pCF111 を有する第一変異株の培養物の TLC 分析結果である。

【図 4】

F. lutescens IFO 3084 (pCF213) (図中、pCF213 と表示) および F. lutescens IFO 3084 (pCF704) (図中、pCF704 と表示) の経時的なホモグルタミン酸の生産性を示すグラフである。

【図 5】

pCF213 インサート領域の塩基配列に基づき見いだされた ORF の存在位置を示す図である。

【図 6】

実施例 2 の 3 (6) における Mono Q HR5/5 カラム処理による溶出画分と相対的 LAT 活性の関係を示すグラフである。

【図 7】

実施例 2 の 3 (7) における、LAT 活性画分をマルチゲル 4/20 および 10/20 に対し、Native PAGE (A) および SDS-PAGE (B) を行った結果を示す図に代わる写真である。図中、M は分子量マーカーであり、C は、実施例 2 の 3 (5) で得られた限外ろ過液、数字はそれぞれ画分番号を示す。

【図 8】

各種プラスミドによるホモグルタミン酸生産性欠損変異株および野生型株における相対的 LAT 活性を示すグラフである。

【図 9】

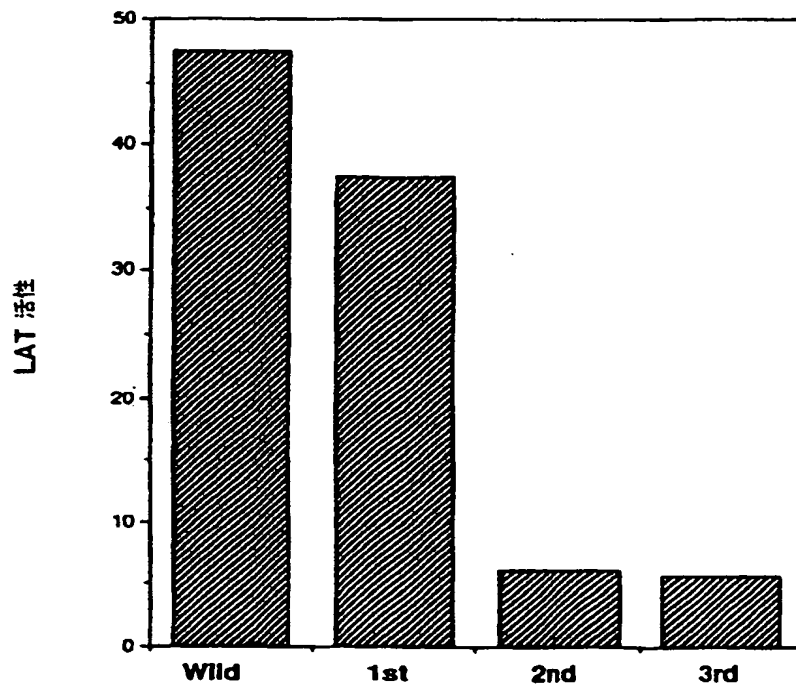
各種プラスミドで形質転換した F. lutescens IFO 3084 株の経時的なホモグルタミン酸の生産性を示すグラフである。

【書類名】 図面

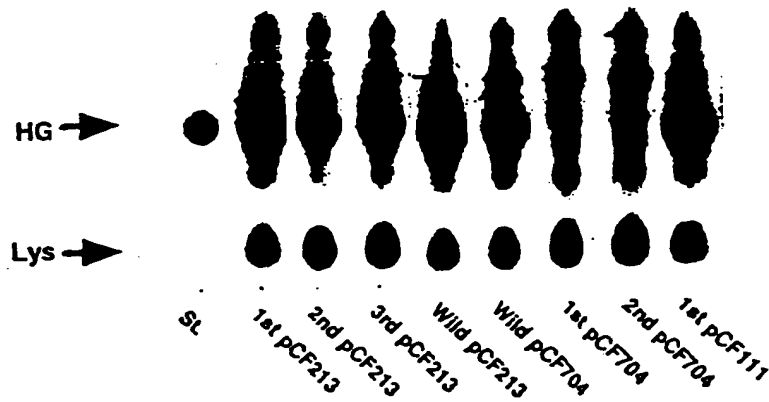
【図 1】



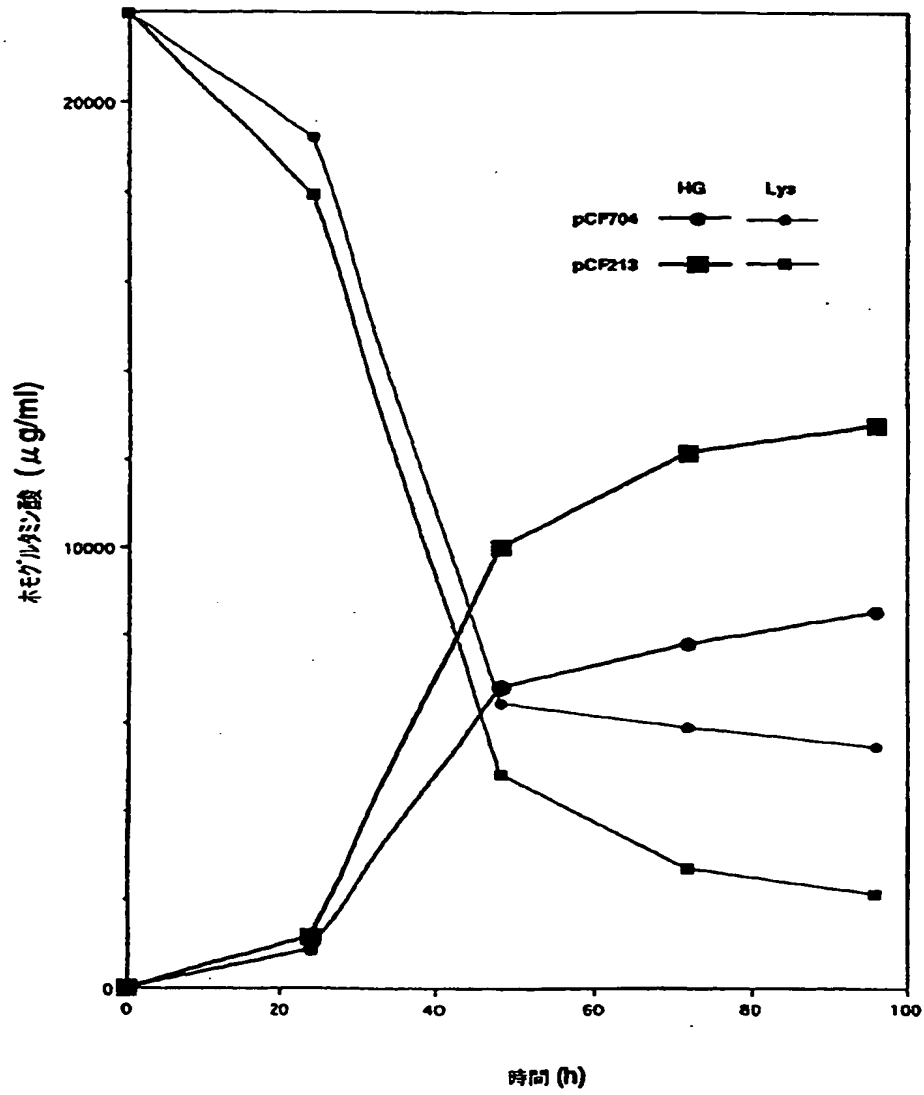
【図 2】



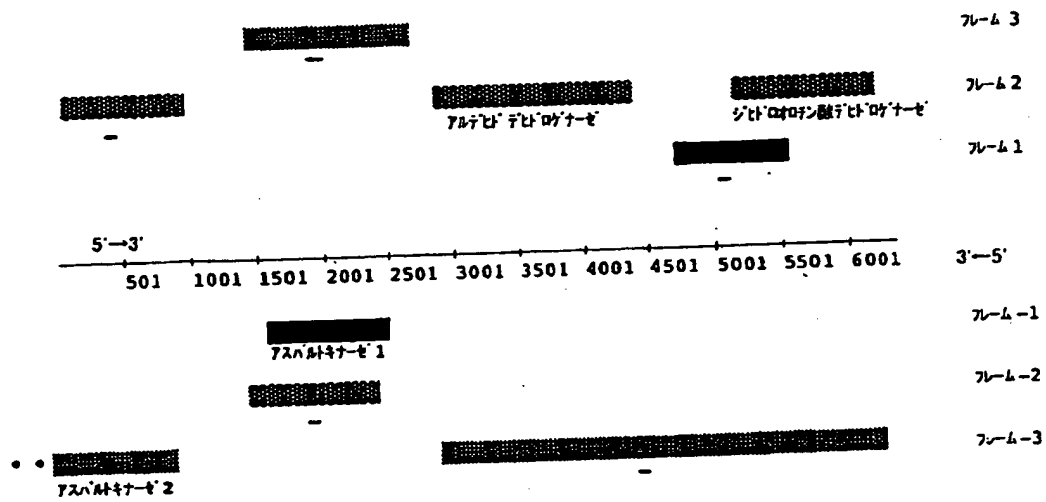
【図 3】



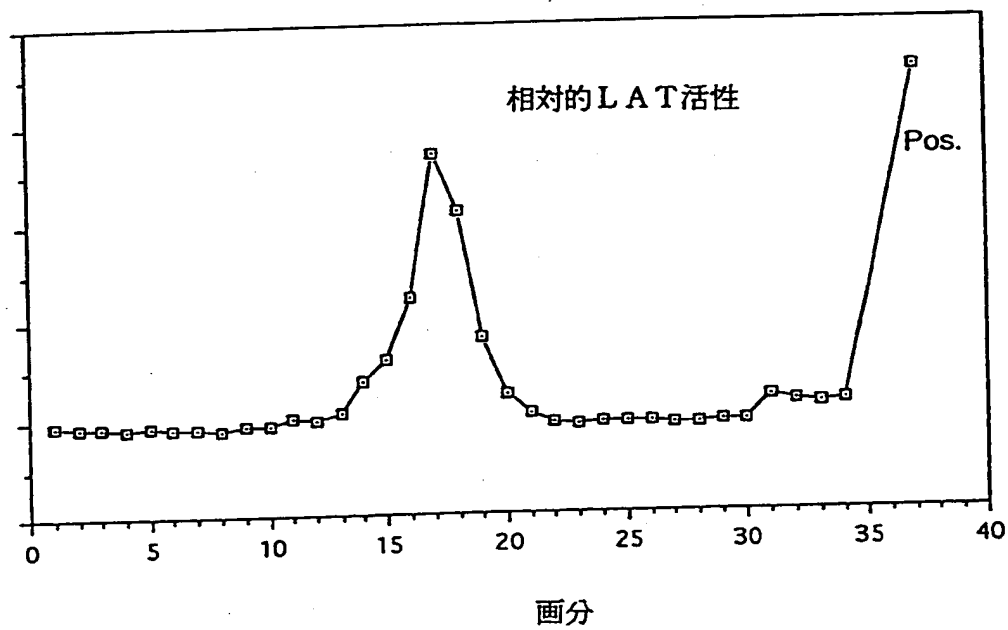
【図 4】



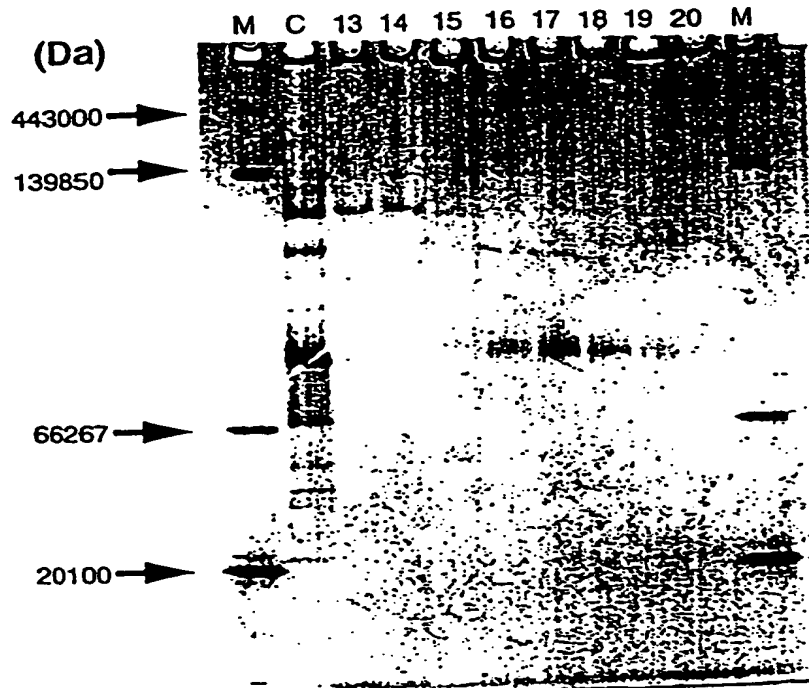
【図5】



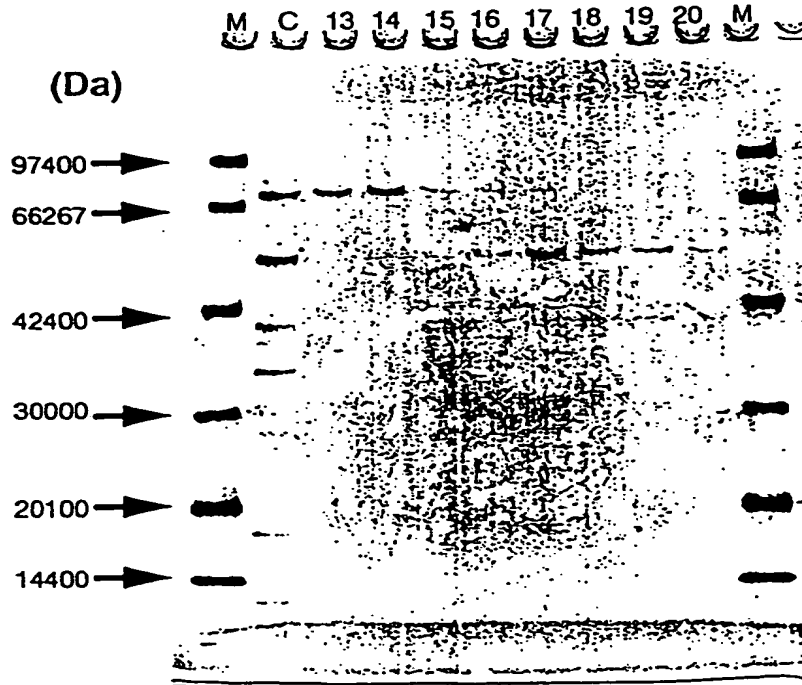
【図 6】



【图7】

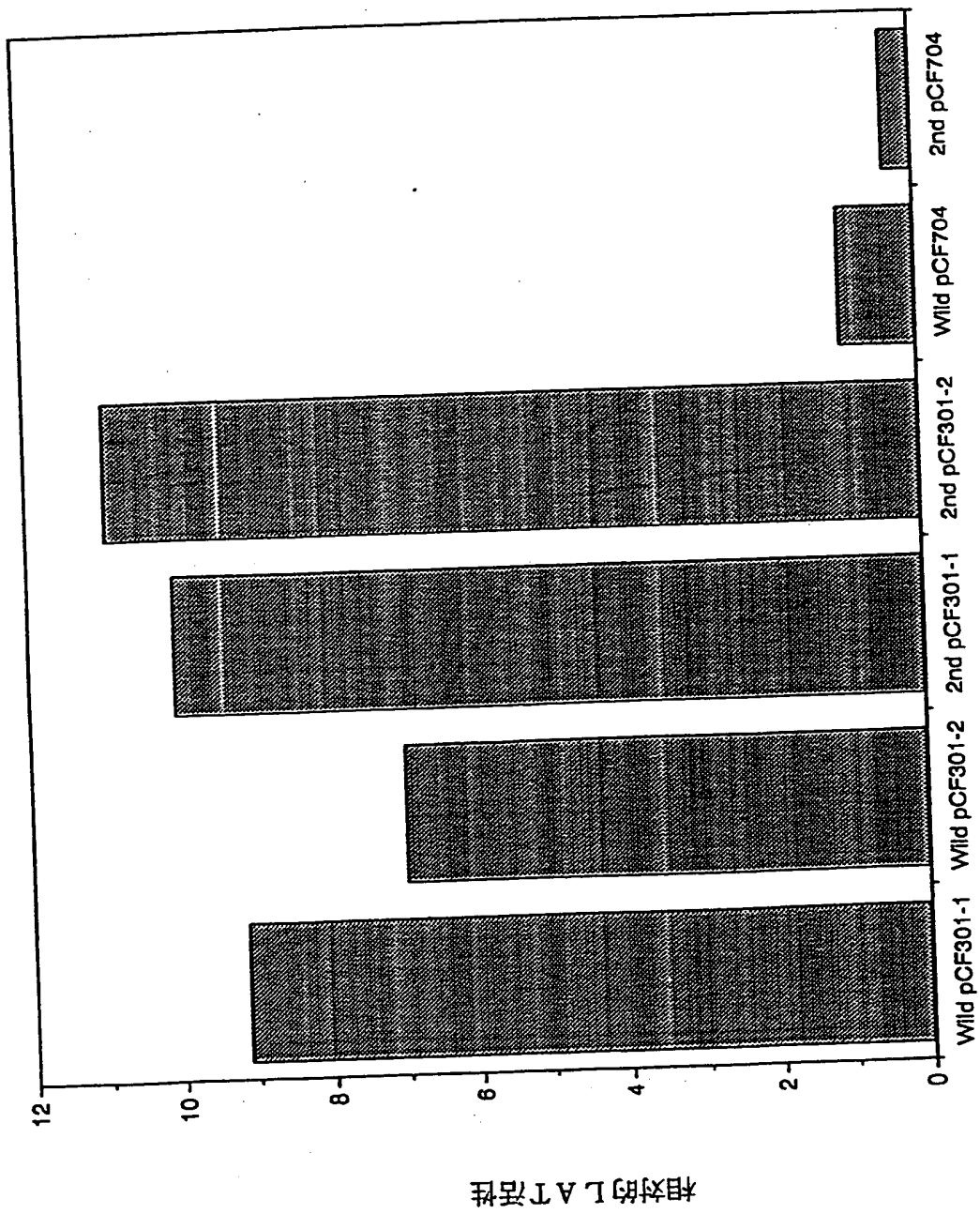


(A)



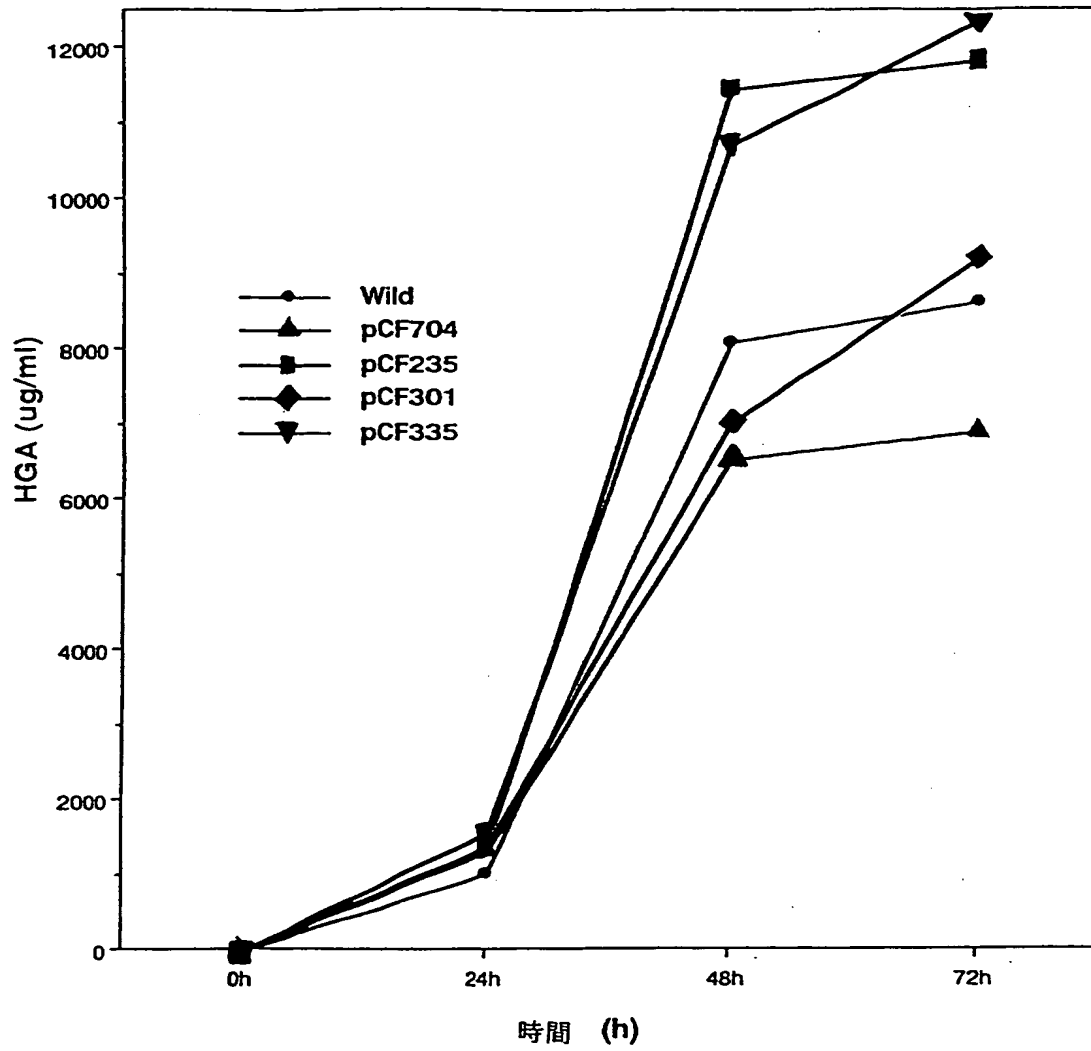
(B)

【図 8】





【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 L-ホモグルタミン酸の生産に関与しうる単離された遺伝子、その遺伝子を用いるL-ホモグルタミン酸の生産系の提供。

【解決手段】 フラボバクテリウム リュテセンス (Flavobacterium lutescens) のゲノムから単離されたL-ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子、該遺伝子を用いるL-ホモグルタミン酸の生産。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成 11 年 特許願 第 182362 号
受付番号	59900617728
書類名	特許願
担当官	宇留間 久雄 7277
作成日	平成 11 年 7 月 7 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000001915

【住所又は居所】

東京都中央区京橋 1 丁目 5 番 8 号

【氏名又は名称】

メルシャン株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100060782

【住所又は居所】

東京都港区赤坂 1-9-15 日本自転車会館内

【氏名又は名称】

小田島 平吉

【選任した代理人】

【識別番号】

100094293

【住所又は居所】

東京都港区赤坂 1 丁目 9 番 15 号 日本自転車会館 小田島特許事務所

【氏名又は名称】

藤井 幸喜

【選任した代理人】

【識別番号】

100103311

【住所又は居所】

東京都港区赤坂 1 丁目 9 番 15 号 日本自転車会館

【氏名又は名称】

小田嶋 平吾

次頁無

【書類名】 手続補正書

【提出日】 平成11年 7月28日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第182362号

【補正をする者】

【識別番号】 000001915

【氏名又は名称】 メルシャン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100060782

【弁理士】

【氏名又は名称】 小田島 平吉

【電話番号】 03-3585-2256

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 委任状

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 委任状 1

19914000008



委任状

平成11年7月21日

私（私ども）は、

識別番号100060782（弁理士） 小田島 平吉 氏  
 識別番号100094293（弁理士） 藤井 幸喜 氏  
 識別番号100103311（弁理士） 小田嶋 平吾 氏

を以て代理人として下記事項を委任します。



1. 特許願

に関する手続

1. 上記出願又は平成10年特許願第232382号

に基づく特許法第41条第1項又は実用新案法第8条第1項の規定による優先権の主張及びその取下げ

1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ

1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求

1. 上記出願に関する補正の却下の決定に対する審判の請求

1. 上記出願に係る特許権、実用新案権、意匠権、商標権又は防護標章登録に基づく権利及びこれらに関する権利に関する手続並びにこれらの権利の放棄

1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護標章）登録に対する登録異議の申立てに関する手続

1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録、意匠登録、商標登録、防護標章登録又は商標（防護標章）更新登録に対する無効審判の請求に関する手続

1. 上記出願に係る特許権に関する訂正の審判の請求

1. 上記出願に係る商標登録に対する取消しの審判の請求に関する手続

1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ

1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと

1. 上記各項の手続を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住所（居所）

東京都中央区京橋一丁目5番8号

氏名（名称）

メルシャン株式会社

代表者

取締役社長 鈴木忠雄



# 認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第182362号
受付番号	19914000008
書類名	手続補正書
担当官	宇留間 久雄 7277
作成日	平成11年 9月 2日

## <認定情報・付加情報>

### 【補正をする者】

【識別番号】	000001915
【住所又は居所】	東京都中央区京橋1丁目5番8号
【氏名又は名称】	メルシャン株式会社

### 【代理人】

申請人	
【識別番号】	100060782
【住所又は居所】	東京都港区赤坂1-9-15 日本自転車会館内
【氏名又は名称】	小田島 平吉

### 【提出された物件の記事】

【提出物件名】	委任状（代理権を証明する書面）	1
---------	-----------------	---

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号                    [000001915]

1. 変更年月日	1990年 8月 8日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区京橋1丁目5番8号
氏 名	メルシャン株式会社

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**